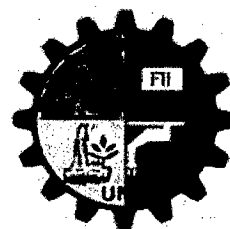


UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOETANOL A
PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CAÑA DE
AZÚCAR (*Saccharum Officinarum L.*)”**

PRESENTADA POR:

SABRINA DE LOS MILAGROS RODRÍGUEZ GARCÍA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

PIURA, PERÚ

MAYO - 2015

7468
no 9

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS.**



ASESOR:

Dr. ALFREDO LUDENA GUTIERREZ

[Handwritten signature]

CO – ASESOR:

Ing. ANTHONY ADANAQUE TIMANÁ

M.Sc.

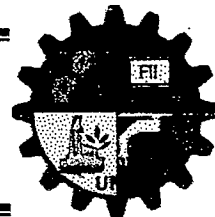
TESISTA:

Br. SABRINA RODRÍGUEZ GARCÍA

[Handwritten signature]



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Calificador Ad-Hoc de la Tesis denominada: «**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)**», presentada por la señorita **SABRINA DE LOS MILAGROS RODRÍGUEZ GARCÍA**, Bachiller de la Escuela Profesional en Ingeniería Agroindustrial e Industrias Alimentarias; asesorada por el **Dr. Alfredo Lázaro Ludeña Gutiérrez** y co asesorada por el **Ing. Anthony Davidson Adanaqué Timaná, MSc.**; reunidos para la sustentación de ésta y luego de escuchar su exposición y las respuestas a las preguntas formuladas, la declaran:



Con el Calificativo:

Aprobado

Sobresaliente

En consecuencia la sustentante se encuentra apta para recibir el título profesional de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**, conforme a Ley.

Piura, 14 de mayo del 2015

C. Zulema

Ing. CARMEN ZULEMA QUITO RODRÍGUEZ, MSc.
PRESIDENTE – JURADO CALIFICADOR

N. J. Zapata

Dr. NÉSTOR JAVIER ZAPATA PALACIOS
VOCAL – JURADO CALIFICADOR

M. V. Seminario Urbina

Ing. MANUEL VICENTE SEMINARIO URBINA, MSc.
SECRETARIO – JURADO CALIFICADOR

RESUMEN

La presente investigación de Tesis “Extracción y Caracterización de Bioetanol a partir de Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum. L.*)”, aborda el uso del método de la explosión por vapor para pre tratar la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar, en el cual se utilizó un diseño factorial determinado por: dos tipos de sustratos de biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar (hojas y tallo), dos periodos de tiempo y dos niveles de temperatura, evaluándose de la siguiente manera:

Hojas de caña de azúcar: Factor A= 210 °C x 5.0 min, Factor B = 210 °C x 10.0 min.

Tallos de caña de azúcar: Factor C= 220 °C x 5.0 min y D= 220 °C x 10.0 min.

Tras el pre tratamiento se llevó a cabo un proceso de fermentación que consistió en un bioproceso consolidado, se utilizó 1.5 ml de inóculo (bacteria *Zymomonas mobilis*), se agregó 100mg/L mosto de Metabisulfito de potasio, NPK 30%, 20gr/L de mosto, controlándose sólidos solubles (°Brix), acidez total (%) y pH.

Se determinó que el tiempo óptimo de fermentación fue de 72 h y el tratamiento de mayor rendimiento de producción de etanol fue S₂T₁P₁ (Sustrato tallo por temperatura de 210°C por periodo de tiempo de 5 min.) con un promedio de producción de 1570.43 ml de etanol/kg de sustrato.

El análisis de calidad realizado al bioetanol obtenido a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar, según los tratamientos evaluados, cumplen los rangos establecidos por INDECOPI en la Norma Técnica Peruana N° 321.126.2011, para etanol anhidro no desnaturalizado. Destacando los tratamientos Tallo x 210 °C x 5.0 min y Hojas x 210 °C x 5.0 min al obtener mejores resultados.

Palabras claves: caña de azúcar, biomasa lignocelulósica, explosión por vapor, bioetanol.

ABSTRACT

This research thesis "Extraction and Characterization of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass Sugar cane (*Saccharum officinarum*. L.)", approach the use of the method of steam explosion for pretreating lignocellulosic biomass sugarcane, in which a factorial design was used determined by: two types of lignocellulosic biomass substrates Sugarcane (leaves and stems), two periods and two temperature levels evaluated as follows:

Sugarcane leaves: Factor A = 210 ° C x 5.0 min, Factor B = 210 ° C x 10.0 min

Stalks of sugar cane: Factor C = 220 ° C x 5.0 min and Factor D = 220 ° C x 10.0 min.

After pretreatment was carried out a fermentation process that consisted of a consolidated bioprocessing, 1.5 ml of inoculum (bacteria *Zymomonas mobilis*) was used, 100mg /L wort metabisulfite, NPK 30%, 20g / L of wine is added, being controlled soluble solids (° Brix), total acidity (%) and pH.

Was determined that the optimal fermentation time was 72 hours and treatment of increased ethanol production yield was S₂T₁P₁ (Substrate stem, temperature of 210 ° C and time of 5 min.) averaging producing ethanol 1570.43 ml / kg substrate.

Quality analyses performed to bioethanol from lignocellulosic biomass of sugarcane, according to the treatments evaluated, meet the ranges established by INDECOPI in Peruvian Technical Norm No. 321.126.2011 for non-denatured anhydrous ethanol. Highlighting steam treatments x 210 x 5.0 ° C min and leaves x 210 x 5.0 ° C min to get better results.

Keywords: Sugar cane, lignocellulosic biomass, steam explosion, bioethanol.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.	3
1.1. Caña de Azúcar (<i>Saccharum officinarum L.</i>)	3
1.1.1. Taxonomía	3
1.1.2. Propiedades físicas de Caña de Azúcar.	4
1.1.3. Composición química de la caña de azúcar	5
1.1.4. Composición química del jugo de Caña de azúcar	5
1.1.5. Prueba de control de calidad del jugo de Caña de Azúcar.	6
1.2. Biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de bioetanol	7
1.2.1. Fuentes de Biomasa	7
1.2.2. Definición: Hoja de Caña de Azúcar	8
1.2.3. Composición química de la hoja de la hoja de caña de azúcar	9
1.2.4. Definición: Bagazo de Caña de Azúcar	9
1.2.5. Estructura del bagazo	10
1.2.6. Composición del bagazo	10
1.2.7. Constitución del bagazo	10
1.2.8. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.	11
1.2.8.1. Material lignocelulósico (MLC)	11
1.2.8.2. Celulosa	11
1.2.8.3. Hemicelulosa	12
1.2.8.3.1. Unidades	12
1.2.8.4. Lignina	13
1.2.8.5. Otras sustancias.	14
1.3. Proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica.	15
1.3.1. Pre tratamiento	16
1.3.1.1. Tipos de pre tratamiento	16
1.3.1.2. Pre tratamiento mecánico	16
1.3.1.3. Pre tratamientos químico	16

1.3.1.4. Pre tratamientos biológicos.	17
1.3.1.5. Pre tratamientos físico-químicos.	18
1.3.1.6. Pre tratamiento de explosión con vapor	19
1.3.1.7. Compuestos tóxicos generados en el pre tratamiento	20
1.3.1.8. Tipos y origen	21
1.3.1.9. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos	23
1.3.2. Hidrolisis enzimática	24
1.3.3. Fermentación	25
1.3.3.1. Fermentación de hexosas	26
1.3.3.2. Fermentación de pentosas	26
1.3.3.3. Fermentación de la xilosa	27
1.3.4. Utilización de levaduras termo tolerantes en los procesos de obtención de etanol	28
1.3.4.1. Uso de hongos	28
1.3.4.2. Uso de bacterias termofilicas	28
1.3.4.3. Zymomonas mobilis	29
1.3.4.3.1. Historia	29
1.3.4.3.2. Especie	30
1.3.4.3.3. Características	30
1.3.4.3.4. Sustratos	31
1.3.4.4. Ruta Entner-Doudoroff (E-D)	31
1.4. Integración de las etapas de proceso	33
1.4.1. Hidrolisis y fermentación separadas (HFS)	33
1.4.2. Sacarificación y fermentación simultaneas (SFS)	33
1.4.3. Sacarificación y cofermentación simultaneas (SCFS)	34
1.4.4. Bioproceso consolidado	35
1.5. Destilación	36
1.5.1. Concepto de destilación	36
1.5.2. Métodos de Destilación	37
1.5.3. Destilación sencilla	37
1.5.4. Destilación fraccionada	38
1.6. Subproducto de la fermentación y destilación	39

1.6.1. Vinaza	39
1.6.2. Aceite fusel (<i>oil</i>)	39
1.7. Impurezas presentes en alcoholes destilados	39
1.7.1. Ácidos	39
1.7.2. Aldehídos	40
1.7.3. Ésteres	40
1.7.4. Alcoholes superiores	41
1.7.4.1. Alcohol metílico	41
1.7.4.2. Alcohol Isopropílico	42
1.7.4.3. Alcohol Isobutílico	42
1.8. Bioetanol	42
1.8.1. Definición	42
1.8.2. Etanol lignocelulósico	43
1.9. Producción nacional y regional de caña de azúcar	43
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo.	45
2.2. Material prima e insumos.	45
2.3. Materiales, equipos y reactivos.	46
2.3.1. Materiales	46
2.3.1.1. Material de vidrio	46
2.3.1.2. Material biológico	46
2.3.1.3. Equipos	46
2.3.1.4. Reactivos	47
2.4. Metodología para la Elaboración de Destilado de Caña de Azúcar	47
2.4.1. Procedimiento experimental para la elaboración alcohol de Biomasa lignocelulósica de Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	47
2.4.2. Análisis de la Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar	52
2.4.3. Métodos de Análisis Físico Químicos	52
2.4.4. Análisis del producto final	53
2.4.5. Diseño experimental y análisis estadístico	56
2.4.5.1. Tratamientos	56
2.4.5.2. Diseño estadístico	56
2.4.5.3. Análisis estadístico	58

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.1. Análisis de físico químico de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar	59
3.2. Análisis de fermentación	61
3.2.1. Variación de sólidos solubles totales	61
3.2.2. Variación de pH	62
3.2.3. Variación de acidez (% Ac. Sulfúrico)	63
3.3. Rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato ⁻¹)	64
3.4. Producción de etanol (%p.v ⁻¹)	70
3.5. Tasa de producción alcohólica (gh.l ⁻¹)	75
3.6. Análisis cromatográfico del etanol	76
3.6.1. Grado alcohólico (°G.L.)	76
3.6.2. Determinación de densidad (g.cm ⁻³)	81
3.6.3. Determinación de pH	84
3.6.4. Determinación de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores)	87
3.6.5. Determinación de Aldehídos (ppm Furfural)	92
3.6.6. Determinación de Acidez (mg Ácido Acético. L Alcohol Anhidro)	96
3.6.7. Determinación de Esteres (ppm Acetato de Etilo)	101
3.6.8. Determinación de Metanol (ppm metanol)	106
CONCLUSIONES	112
RECOMENDACIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	116

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1.1. Composición química de la caña de azúcar	5
1.2. Composición química del jugo de caña de azúcar	6
1.3. Composición química de la hoja de caña de azúcar	9
1.4. Composición de Celulosa, Hemicelulosa y Lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos	14
1.5. Descripción de las diferentes configuraciones de proceso con diferentes niveles de integración.	36
1.6. Principales componentes de la vinaza	39
1.7. Especificaciones del Bioetanol	43
1.8. VBP Agropecuario de la Caña de Azúcar	44
1.9. Producción de caña de Azúcar (tn)	44
2.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar	52
2.2. Análisis de mosto biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar pre tratada durante la etapa de fermentación	52
2.3. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar	53
2.4. Componentes utilizados para Solución patrón – A	54
2.5. Tratamientos	56
2.6. Diseño factorial	57
2.7. Análisis de varianza para el experimento	58
3.1. Resultados de Análisis físico – químico de biomasa lignocelulósica promedio del cultivo de Caña de Azúcar	60
3.2. Análisis de varianza para el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹)	67
3.3. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹)	67

3.4.	Análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v-1).	72
3.5.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v ⁻¹)	72
3.6.	Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l ⁻¹).	75
3.7.	Análisis de varianza para el grado alcohólico (°G.L.)	78
3.8.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el grado alcohólico (°G.L.)	79
3.9.	Análisis de varianza para la densidad (g.cm ⁻³)	83
3.10.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de densidad (g.cm ⁻³).	83
3.11.	Análisis de varianza para el pH	86
3.12.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el pH	87
3.13.	Análisis de varianza para la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores)	89
3.14.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores)	90
3.15.	Análisis de varianza para la concentración de aldehídos (ppm Furfural)	94

3.16.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural)	94
3.17.	Análisis de varianza para la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹)	99
3.18.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez (mg Ácido Acético. L Alcohol Anhidro ⁻¹).	99
3.19.	Análisis de varianza para la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo)	104
3.20.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo)	104
3.21.	Análisis de varianza para la concentración metanol (ppm metanol)	109
3.22.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la concentración metanol (ppm metanol)	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1.1. Calidad de la Caña de Azúcar	7
1.2. Matriz pectocelulósica	8
1.3. Partes de la hoja de caña de azúcar	9
1.4. Estructura primaria de la celulosa	11
1.5. Fibrilla elemental o micela	12
1.6. Representaciones de Hawort de las principales hexosas presentes en las hemicelulosas	12
1.7. Representaciones de Hawort de las principales pentosas presentes en las hemicelulosas	13
1.8. Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina	14
1.9. Rutas tecnológicas para la obtención de bioetanol	15
1.10. Principales productos de degradación originados en el pre tratamiento de la biomasa lignocelulósica	21
1.11. Vía metabólica de formación de productos por <i>Zymomonas mobilis</i>	32
1.12. Esquema de la destilación sencilla	38
1.13. Esquema de rectificación intermitente	38
2.1. Operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar	51
3.1. Rendimiento físico del proceso de producción de etanol a de Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar (<i>Saccharum Officinarum L.</i>).	66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
3.1. Variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio	61
3.2. Variación del pH en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio	62
3.3. Variación del contenido de Acidez (% Ac. Sulfúrico) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.	63
3.4. Efecto principal tipo de sustrato sobre el rendimiento físico (ml Etanol . kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto	68
3.5. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto	68
3.6. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato-1), del etanol obtenido como producto	69
3.7. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato-1), del etanol obtenido como producto	69
3.8. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la producción de etanol (%p.v-1) del etanol obtenido como producto	73
3.9. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto	73
3.10. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto	74
Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto	74
3.11.	
3.12. Tasa promedio de producción alcohólica (g.l ⁻¹ h)	76
3.13. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el grado alcohólico (°G.L.), del etanol obtenido como producto	79

3.14.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el grado alcohólico (°G.L.), del etanol obtenido como producto	80
3.15.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre el grado alcohólico (°G.L.), del etanol obtenido como producto	80
3.16.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la densidad (g.cm-3), del etanol obtenido como producto	84
3.17.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto	90
3.18.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto	91
3.19.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto	91
3.20.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto	95
3.21.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto	95
3.22.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto	96
3.23.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético. L Alcohol Anhidro-1), del etanol obtenido como producto	100
3.24.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético. L Alcohol Anhidro-1), del etanol obtenido como producto	100

3.25.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez total (mg Ácido Acético. L Alcohol Anhidro-1) del etanol obtenido como producto	101
3.26.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto	105
3.27.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo), del etanol obtenido como producto	105
3.28.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto	106
3.29.	Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto	110
3.30.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto	110
3.31.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.	111
3.32.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto	111

ANEXOS

	Pág.
I. Análisis de biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar	125
1.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de caña de azúcar	125
II. Análisis de fermentación de biomasa lignocelulósica del cultivo de caña de azúcar	126
2.1. Datos de variación de sólidos solubles (°Brix) en la etapa de fermentación.	126
2.2. Datos de variación de pH en la etapa de fermentación.	126
2.3. Datos de variación de acidez (% ác. sulfúrico) en la etapa de fermentación.	127
2.4. Rendimiento físico (l.ha-1)	128
2.5. Datos de producción de etanol (%p.v-1) durante el proceso de fermentación	129
2.6. Datos de tasa de producción de etanol (g h.l-1)	130
III. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.	131
3.1. Determinación de la concentración del etanol (°G.L.) obtenido en la etapa de la destilación.	131
3.2. Determinación de la densidad (g.cm-3) del etanol obtenido en la etapa de la destilación.	131
3.3. Determinación del pH para el etanol obtenido en la etapa de la destilación.	132
3.4. Determinación de alcoholes superiores (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.	132
3.5. Determinación de aldehídos (ppm Furfural) obtenidos en la etapa de la destilación.	133
3.6. Datos del Gasto de hidróxido de sodio (mL) en soluciones alcohólicas obtenidas como producto.	133

3.7.	Datos de la Acidez Total (mg Ácido Acético /L Alcohol Anhidro) del etanol obtenido como producto.	134
3.8.	Determinación de esteres (ppm Acetato de etilo) obtenidos en la etapa de la destilación.	134
3.9.	Determinación de Metanol (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.	135
IV.	Fotos de los diferentes procedimientos para la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.	135
4.1.	Procedimiento de los análisis de calidad de la biomasa lignocelulósica.	135
4.2.	Fotos de los análisis físico – químico de la materia prima.	136
4.3.	Fotos del pre tratamiento de la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.	137
4.4.	Fotos del proceso de fermentación de la biomasa lignocelulósica.	138
4.4.1.	Fotos de la preparación del inóculo de la bacteria <i>zymomonas mobilis</i> .	138
4.4.2.	Fotos de la etapa del proceso de fermentación de la biomasa lignocelulósica.	139
4.5.	Fotos del proceso de destilación para la obtención de bioetanol.	140
4.6.	Fotos del análisis del bioetanol obtenido como producto.	142

INTRODUCCIÓN

La producción de alcohol, principalmente para combustible automotor, de materias primas vegetales se enmarca en este nuevo panorama, el aumento de la producción de alcohol en el mundo está aparejado con el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan obtener bioetanol a partir de residuos agrícolas, maderables, y de todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosa. (Kim, 2001).

Para Elobeid A. *et al.*, (2011), la búsqueda de una alternativa renovable debe lograrse mediante el uso de materiales lignocelulósicos para producir etanol. Entre los materiales lignocelulósicos más estudiados se hallan los residuales agrícolas de la industria azucarera, siendo el bagazo de la caña de azúcar, el material más utilizado debido a que es un residuo abundante, renovable y de bajo costo. Con fundamento en este punto de vista, el uso del bioetanol de material lignocelulósico de caña de azúcar ofrece la perspectiva concreta de una realidad energética más sostenible y hacen de la agroindustria la palanca de deseables transformaciones sociales y económicas, involucrando tecnologías de hidrólisis para la producción de bioetanol que se consideran procesos volcados a la valorización de los materiales lignocelulósicos.

El Capítulo I, aborda el uso de tecnologías complejas como el método de explosión por vapor para pre tratar la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar dando lugar a una buena recuperación de azúcares. Durante este pre tratamiento se produce la descomposición de sus componentes (celulosa, hemicelulosa, lignina) y la generación de compuestos tóxicos derivados de la degradación de los azúcares.

Además, se describen los proceso de fermentación, en especial el bioproceso consolidado que consiste en la integración de las etapas biológicas necesarias para la transformación de la lignocelulosa a etanol en un único proceso: producción de las enzimas, hidrólisis del material pre tratado a azúcares y fermentación. Para la ejecución de dicho proceso se necesita un único microorganismo capaz de hidrolizar y fermentar la biomasa pre tratada sin adición de enzimas exógenas; se determinó utilizar la bacteria *Zymomonas mobilis* existente en fuentes naturales como en jugos de frutas, puesto que, es capaz de producir etanol de manera muy eficiente a través de la fermentación de azúcares vía de *Entner-Doudoroff*, también se describe los tipos de destilación usados para el proceso de

obtención del bioetanol, los cuales se refieren a la separación física de una mezcla en dos o más fracciones que tiene distintos puntos de ebullición. (Holland, 1992).

El Capítulo II, detalla los diferentes materiales y métodos utilizados en el proyecto. La investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Agrícolas de la Facultad de Agronomía, en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Piura; y en el Laboratorio Control de Calidad de Etanol de la Empresa Agroindustrial Caña Brava - Grupo Romero. En los siguientes capítulos se describe los resultados, discusiones y anexos del proyecto. Además, se detalla los tipos análisis físicos químicos, que se realizaron a la biomasa lignocelulósica (determinación de humedad, cenizas, grasa, celulosa, etc.), análisis durante la etapa de fermentación (°Brix, acidez, pH), y para el bioetanol obtenido como producto (determinación de alcoholes superiores).

Bajo esta línea de investigación, se desarrolló la tesis titulada “Extracción y Caracterización de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum L.*)”, a fin de caracterizar la fermentación de los azúcares obtenidos por el pre tratamiento con vapor de agua e hidrólisis enzimática del bagazo y hojas de Caña de Azúcar, bajo condiciones de temperaturas de 210 a 220 °C y tiempo de reacción de 10 y 5 minutos. Adoptando como objetivos:

- ✓ Caracterizar físico - químicamente la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.
- ✓ Determinar la variación en la concentración de sólidos (expresado en grados °Brix), el pH, acidez titulable (%) y temperatura de operación (°C) en el mosto (sustrato) durante la etapa de fermentación.
- ✓ Determinar el óptimo tiempo de fermentación y el tratamiento de mayor rendimiento de producción de etanol (ml de etanol/kg de sustrato).
- ✓ Determinar las características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Caña de azúcar. Es el nombre común de esta especie de herbáceas, vivaces, de tallo leñoso de un género (*Saccharum*) de la familia de las gramíneas (*Gramineae*), originaria de la Melanesia y cuya especie fundamental es *Saccharum Officinarum* L. Fue introducida en Cuba por el año 1535 desde Santo Domingo.

La caña de azúcar se cultiva mucho en países tropicales y subtropicales de todo el mundo por el azúcar que contiene en los tallos, formados por numerosos nudos. Es un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz. La caña alcanza entre 3 y 6 m de altura y entre 2 y 5 cm de diámetro. El sistema radicular lo compone un robusto rizoma subterráneo.

El tallo acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado en el ingenio forma el azúcar.

La sacarosa es sintetizada por la caña gracias a la energía tomada del sol durante la fotosíntesis con hojas que llegan a alcanzar de dos a cuatro metros de longitud. En su parte superior encontramos la panocha, que mide unos 30 cm. de largo.

Según MINAG 2013, la producción mundial de caña de azúcar en el 2008 – 2009 fue de 1,558 millones t, siendo el principal productor Brasil con 33 % de la producción mundial, India 23 % China 7 %, Pakistán 4 %, México 3 %, Tailandia 4% y otros países representan el 26%; para la India, Pakistán y Tailandia, representa la base fundamental de su economía.

Siendo el líder en el mercado mundial actualmente Brasil, se basa en los menores costos de producción y a la activa presencia del sector alcoholero como una importante alternativa de los subproductos de la caña en ese país.

1.1.1. Taxonomía

Díaz *et al.*, (2002), menciona el reporte de la clasificación taxonómica de la planta de caña de azúcar.

- Reino : *Plantae*
- División : *Magnoliophyta*
- Subdivisión : *Angiospermaphytæ*
- Clase : *Angiospermae*
- Subclase : *Monocotyledoneae*
- Orden : *Commelinales*
- Suborden : *Commelinidae*
- Familia : *Poaceae*
- Género : *Saccharum*
- Especie : *Officinarum L.*

1.1.2. Propiedades físicas de Caña de Azúcar.

Díaz, *et al.*, (2002), menciona que la caña de azúcar es una de las especies de plantas terrestres más eficientes, con alta producción de hojas y tallos que en su madurez tiene la mitad de su biomasa en forma de fibra y azúcares. Es una planta que presenta una amplia variabilidad y una reconocida capacidad de adaptación cuando es sometida a condiciones desfavorables, de clima, suelo y manejo. Es decir, se sustenta en ventajas como su adaptación a un amplio ámbito de condiciones agroecológicas, pobres condiciones de fertilidad del suelo y a regímenes cálido – húmedos prolongados.

La caña de azúcar es una planta perenne, tiene el tallo macizo, que puede llegar a medir hasta 6 metros de altura; este tallo consta de dos partes diferenciadas: un tejido esponjoso y dulce en la parte central (médula, del que se extrae un jugo rico en sacarosa (azúcar); y una parte periférica, rica en fibra, que en el proceso de extracción del azúcar constituirá el bagazo. La conformación y características propias de la especie (*S. officinarum*), proporcionan mecanismos necesarios y suficientes para caracterizarla como una planta altamente eficiente, lo que favorece su capacidad de adaptación.

Cuanto más seco es el clima, mayor es el contenido de jugo en el interior del tallo. El número de tallos de la planta, el color y el hábito de crecimiento depende de la variedad de la planta. En general, puede tener de uno hasta tres tallos. Típicamente se conoce que el tallo de las cañas es liso con “anillos” fibrosos, que se denominan nudos. Las partes que se encuentran entre nudo y nudo del tallo se denominan entrenudos.

Sus hojas se originan en los nudos del tallo, son largas y alenguadas. La flor es una inflorescencia en forma de panícula de pequeñas espigas: sedosas, largas y vellosas. Cada inflorescencia suele tener un tallo principal o raquis que contiene una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Florece según los países donde crezca, en los límites de su área. El fruto cuando lo da, es muy pequeño.

Su raíz es un sistema radicular. Es decir, podemos diferenciar dos tipos de raíces: las primordiales, delgadas y muy ramificadas, que pueden vivir hasta tres meses; y las raíces permanentes, que brotan de los nuevos tallos de la caña. La caña puede multiplicarse mediante acodos, plantando un tallo que tenga un nudo y una yema incipiente.

1.1.3. Composición Química de la caña de azúcar

La naturaleza química de la caña de azúcar presenta características que están representadas por la gran cantidad de azúcares solubles, específicamente sacarosa y por la presencia en cantidades considerables de azúcares insolubles de origen estructural especialmente celulosa, hemicelulosa y lignina, se muestra en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Composición química de la caña de azúcar

Nutrientes	% (M.S)
Materia seca	29
Proteínas	2
Hemicelulosa	20
Celulosa	27
Lignina	7
Azúcares solubles	40
Cenizas	5

Fuente: (Krishna *et al.*, 2001).

1.1.4. Composición química del jugo de Caña de Azúcar.

Sánchez O., (2007), define el jugo de Caña de Azúcar como el líquido obtenido de la molienda de la caña de azúcar, el mismo que es utilizado en las industrias productoras de panela, azúcar y alcohol presentados en el cuadro 1.2.

Krishna *et al.*, (2001), menciona que la Caña de Azúcar está constituida principalmente por jugo y fibra, siendo la fibra la parte insoluble en agua formada por celulosa, la que a su vez se compone de azúcares simples como la glucosa.

A los sólidos solubles en agua expresados como porcentaje y representados por la sacarosa, los azúcares reductores y otros componentes, comúnmente se les conoce como °Brix. La relación entre el contenido de sacarosa presente en el jugo y el °Brix se denomina pureza del jugo.

El contenido “Aparente” de Sacarosa, expresado como un % en peso y determinado por polarimetría, se conoce como “*Pol*”. Los sólidos solubles diferentes de la sacarosa, que contempla los azúcares reductores como la glucosa y la fructuosa y otras sustancias orgánicas e inorgánicas, se denominan usualmente “*No Pol*” o “No Sacarosa”, los cuales corresponden porcentualmente a la diferencia entre °Brix y Pol.

Cuadro 1.2. Composición química del jugo de Caña de Azúcar.

Componente	(%)
Agua	81 – 85
Sólidos solubles	15 – 19
Sales	0.23 – 0.67
Proteínas	0.08 – 0.11
Gomas – Almidones	0.05 – 0.11
Sacarosa	12.5 – 16.72
Glucosa	0.3 – 0.76
Fructosa	0.3 – 0.76
Materia orgánica (no azúcares)	0.5 – 1
Compuestos inorgánicos	0.2 – 0.6
Cuerpos nitrogenados	0.5 – 1

Fuente: (Sánchez O. 2007).

1.1.5. Prueba de control de calidad del jugo de Caña de Azúcar.

La Comisión Internacional para los Métodos Uniformes de Análisis de Azúcares (ICUMSA, 2005), los principales parámetros que intervienen en el desarrollo de la caña de azúcar son la temperatura, humedad y luminosidad. En el tallo, se acumula el jugo compuesto esencialmente por agua y una parte sólida rica en sólidos solubles tales como la sacarosa, glucosa y fructosa pero también contiene otros nutrientes y micronutrientes. Es así que, además al jugo de la caña de azúcar se le hace un estudio de ART para saber si el contenido de °Brix es apto para ingresar a la molienda. El desarrollo de este método analítico es esencial en el seguimiento y control del proceso de obtención de bioetanol.

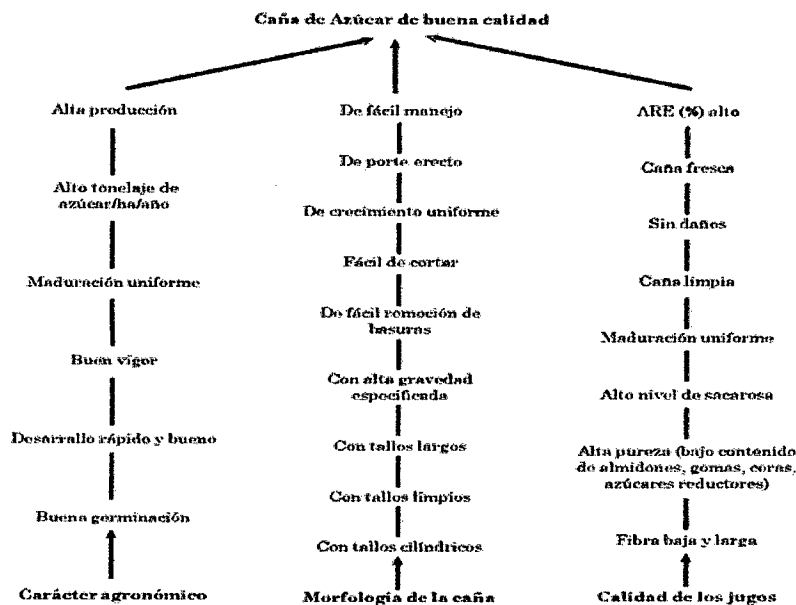


Figura 1.1. Calidad de la Caña de Azúcar.

Fuente: (Carroll *et al.*, 2009).

1.2. Biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de bioetanol.

1.2.1. Fuentes de biomasa.

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. La formación de biomasa vegetal a partir de luz solar se lleva a cabo mediante la fotosíntesis, gracias a la cual se forman moléculas de alto contenido energético en forma de energía química. Atendiendo a su origen, la biomasa se puede clasificar en (Ballesteros, 2006):

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales.
- Biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial.
- Cultivos energéticos, son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios.

Las paredes lignocelulósicas son estructuras de mayor complejidad y difícil accesibilidad para algunos componentes y forman los materiales lignocelulósicos. Como se muestra en la figura 1.2.

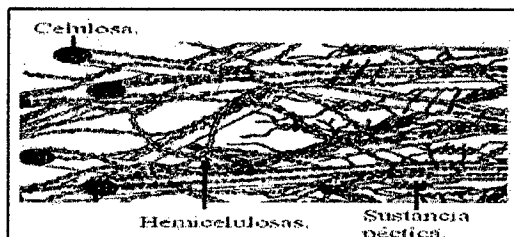


Figura 1.2. Matriz pectocelulósica.

Fuente: (Bidlack *et al.*, 1992).

En este proyecto de investigación se utilizó como materia prima lignocelulósica hojas y tallos de la caña de azúcar.

1.2.2. Definición: Hoja de Caña de Azúcar

Las hojas de la caña de azúcar brotan de los nudos del tallo en forma alterna, formando dos hileras opuestas en un mismo plano. A medida que las hojas envejecen, se van separando del eje del tallo y toman la posición inclinada que las caracteriza. El resultado, es que ellas están sostenidas en dos hileras y se desarrollan en forma de Abanico. El ancho y largo de la hoja son caracteres dependientes de las especies originales. Así, el *Saccharum officinarum* tiene hojas largas y anchas. La hoja consta de dos partes fundamentales: la lámina o limbo y la vaina.

La vaina de la hoja es de forma tubular y cónica hacia el cuello. En ella pueden apreciarse dos caras: una interior generalmente blanquecina y lisa, y otra exterior de color verde, que con frecuencia presenta abundantes vellos que en algunas variedades hacen desagradable su manipulación y es generalmente de un color verde claro.

La lámina o Limbo (que significa cinta, franja) de la hoja de caña puede alcanzar una longitud de hasta 2 m. y su ancho varía entre 3 y 7 cm. Estas dimensiones cambian en cada variedad, de modo que se manifiestan los caracteres predominantes de las especies originales. Su color varía desde un verde amarillento hasta un verde muy oscuro, dependiendo tanto de la variedad como del estado de nutrición de la planta.

La unión de la vaina con la lámina de la hoja se denomina cuello o *Dewlap*. Esta unión varía en las diferentes variedades, así como también en una misma variedad, en la medida en que ésta madure. Las formas de los dewlaps en hojas ya maduras constituye una característica importante, clasificadas en tres tipos principales: rectangular o cuadrada, triangular y ligular; aparte de los tres citados, existen infinidad de tipos

intermedios. Además de las partes mencionadas de la vaina, en la misma pueden observarse dos tipos de apéndices membranosos: la Lígula y las Aurículas.

La lígula (que significa lengua) es un apéndice membranoso que sirve de separación entre la vaina y la lámina, las aurículas (que significa oreja, repliegue), son unos apéndices de formas que recuerdan a las orejas, ubicados en el margen de la vaina y en su extremo superior. Como se muestra en la figura 1.3.

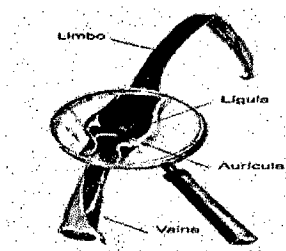


Figura 1.3. Partes de la hoja de caña de azúcar

Fuente: (Manual de plantas agrícolas, 2002)

1.2.3. Composición química de la hoja de la hoja de caña de azúcar

La composición química de la hoja, es también muy variable, siendo influenciada por el clima, suelo, variedad, etc.; se considera que fluctúa entre los siguientes límites: Presentados en el cuadro 1.3.

Cuadro 1.3. Composición química de la hoja de caña de azúcar.

Contenido	(%)
Agua	70 a 74
Cenizas	2 a 5
Grasas	0.70
Sustancias nitrogenadas	1.5 a 2
Fibras (celulosa, ligninas)	15 a 19
Azúcares	2 a 4

Fuente: (Fisiología de la caña de azúcar, 1995)

1.2.4. Definición: Bagazo de Caña de Azúcar

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se obtiene como subproducto o residuo en los centrales azucareros después de la extracción del jugo de caña de azúcar y representa aproximadamente entre el 25 y 40% del total de materia procesada (Sica, 2006).

El bagazo como todos los materiales lignocelulósicos es rico en fibra; sin embargo debido a su compleja estructura son de difícil digestibilidad en caso de su utilización, por lo que es necesario someterlos a tratamientos que conduzcan a la disminución o eliminación de barreras físicas y químicas, tales como la cristalinidad de la celulosa, los grupos acetilos de la hemicelulosa y los enlaces entre celulosa y lignina.

1.2.5. Estructura del bagazo

El bagazo consta de dos partes fundamentales:

- La fibra: Fibras relativamente largas, derivadas principalmente de la corteza y otros haces de fibra del interior del tallo. La longitud media de las fibras del bagazo es de 1 a 4 milímetros y su ancho varía entre 0.01 y 0.04 milímetros.
- El meollo: Se deriva del parénquima, parte de la planta donde se almacena el jugo que contiene el azúcar.

1.2.6. Composición del bagazo

- Humedad (50%)
- Sólidos solubles (5%)
- Sólidos insolubles o fibra cruda (45%)

Además su composición química es la siguiente:

- Carbono: 47 %
- Hidrógeno: 6,5 %
- Oxígeno: 44 %
- Cenizas: 2,5 %

1.2.7. Constitución del bagazo

- Celulosa (50%)
- Hemicelulosa (25%)
- Lignina (20%)
- Otros componentes (5%)

1.2.8. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.

1.2.8.1. Material lignocelulósico (MLC).

Está constituido por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina.

1.2.8.2. Celulosa.

La celulosa es un polímero lineal de monómeros de D-glucosa que se unen por enlaces β -(1 \rightarrow 4) cuyo peso molecular medio es de 100.000. Se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas. Las estructuras fibrilares están estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intermoleculares y todos los átomos de carbono están fijados en una posición concreta respecto a los otros. (McKendry, 2002).

La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las protofibrillas y microfibrillas son aspectos muy importantes que condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar. (Zhang y Lynd, 2004).

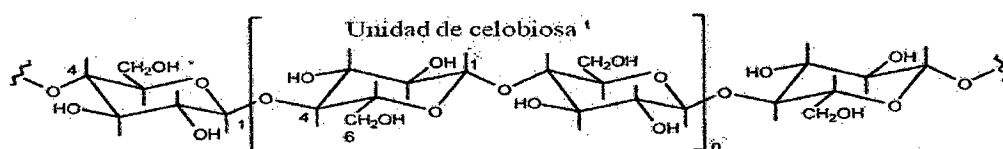


Figura 1.4. Estructura primaria de la celulosa

Fuente: (Bidlack *et al.*, 1992).

La presencia de regiones amorfas en la fibrilla elemental permiten mejor penetración de reactivos químicos, por tanto mayor elasticidad. Los disolventes pueden entrar mejor en el material y las enzimas del tipo de las celulasas puedan presentar mejor si se aumenta la proporción de estas zonas. A esta pérdida de zonas cristalinas y aumento de regiones amorfas se la suele designar como “pérdida de cristalinidad”. Se muestra en la figura 1.5.

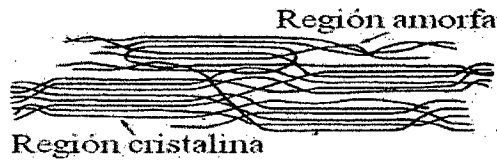


Figura 1.5. Fibrilla elemental o micela.

Fuente: (Bidlack *et al.*, 1992).

Las microfibrillas que forman las paredes celulares de los vegetales y que se orientan de distinta forma según las capas están formadas a partir de las fibrillas elementales. Además, esta estructura que presenta los grupos $-OH$ formando puentes de hidrogeno en estructura con forma de cinta presenta los hidrógenos en su superficie, resultando hidrofóbica.

1.2.8.3. Hemicelulosa.

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), azúcar y ácidos, entrelazadas entre si glucosídicamente. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina. (Galbe, 2002).

1.2.8.3.1. Unidades

Las unidades de los monómeros que constituyen las hemicelulosas son principalmente monosacáridos y ácidos urónicos. Los monosacáridos principales que encontramos en las hemicelulosas son tres hexosas: glucosa, manosa y galactosa. Se muestra en la figura 1.6 y 1.7.

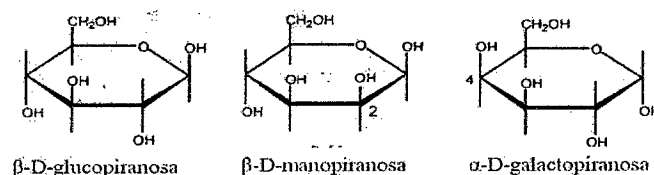


Figura 1.6. Representaciones de Hawort de las principales hexosas presentes en las hemicelulosas. Fuente: (Galbe, 2002).

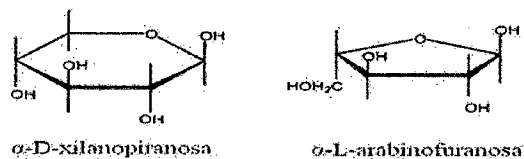


Figura 1.7. Representaciones de Hawort de las principales pentosas presentes en las hemicelulosas. Fuente: (Galbe, 2002).

Existen las sustancias pécticas forman la pectina que puede considerarse como un compuesto cementante de la pared celular que nada tiene que ver con la hemicelulosa; de esta forma se puede considerar que los componentes que unen micelas, microfibrillas o células continuas son la lignina, la hemicelulosa y la pectina o sustancias pécticas.

1.2.8.4. Lignina

La lignina es un polímero aromático de estructura tridimensional bastante compleja, muy ramificada y amorfa, formada por la condensación de precursores fenólicos unidos por diferentes enlaces, tejido o capa de la pared celular, estado de desarrollo y condiciones ambientales.

Funciones:

- Proteger a la celulosa del ataque microbiano.
- Conferir resistencia e impermeabilidad al material.
- Mantener unidas las fibras celulósicas.

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada. Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos, diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S), la lignina no presenta una única estructura (Galbe, 2002).

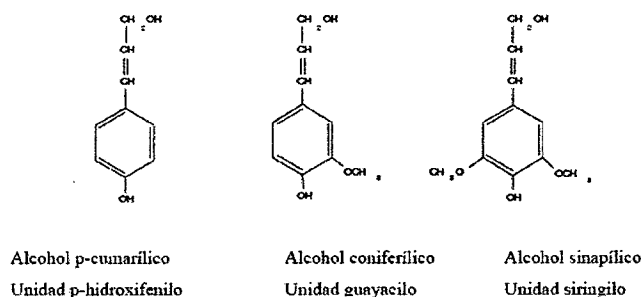


Figura 1.8. Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina.

Fuente: (Galbe, 2002).

Cuadro 1.4. Composición de Celulosa, Hemicelulosa y Lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos.

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallos de maderas duras	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Tallos de maderas blandas	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Mazorca de maíz	45	35	15
Paja de arroz	32,1	24	18
Bagazo	33,4	30	18,9
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15 -20	80 - 85	0
Pasto	45	31,4	12
Papel	85 - 99	0	0 - 15

Fuente: (SUN, Y; CHENG, J. 2001).

1.2.8.5. Otras sustancias.

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros. Los componentes solubles en solventes neutros, representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

1.3. Proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica.

Para que los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica den lugar a azúcares potencialmente fermentables, se debe someter a la biomasa a una etapa de hidrólisis. La hidrólisis de los polisacáridos puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida puede realizarse mediante un ácido concentrado o un ácido diluido. Al utilizar ácidos concentrados, la gran cantidad de ácido empleada, lo costoso de su recuperación y la necesaria neutralización del medio antes de la fermentación unida a los efectos corrosivos de los ácidos hacen que el proceso no sea rentable económicamente. Si se emplean ácidos diluidos se requieren temperaturas relativamente altas que provocan una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos. Es por ello que, los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática (HE) son los que se muestran como opciones más prometedoras. El proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica basado en la HE consta básicamente de las siguientes etapas: pre tratamiento, HE, fermentación y destilación. Estas etapas pueden llevarse a cabo mediante distintas configuraciones de proceso o diferentes niveles de integración como será discutido más adelante. Se muestra en la figura 1.9.

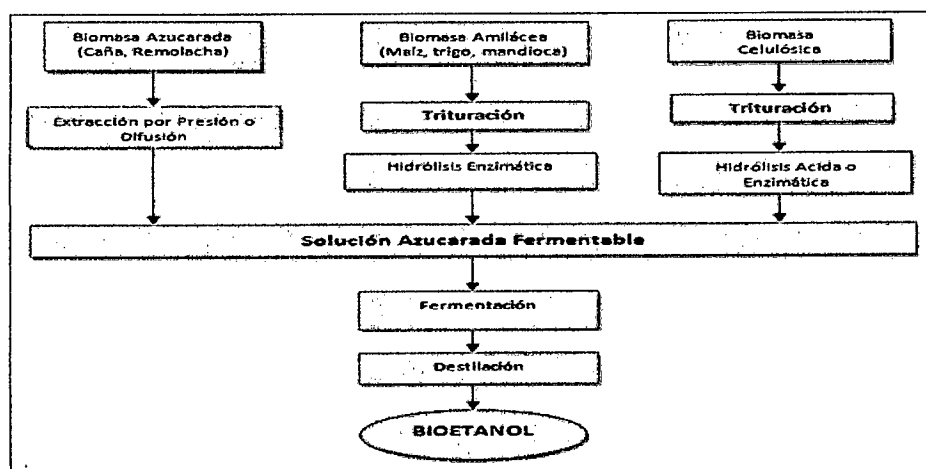


Figura 1.9. Rutas tecnológicas para la obtención de bioetanol.

Fuente: (Luis Horta 2008).

1.3.1. Pre tratamiento

Etapa indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Se hace necesario principalmente porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma unas barreras contra el ataque enzimático. Un pre tratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial (Krishna *et al.*, 2001).

1.3.1.1. Tipos de pre tratamiento

1.3.1.2. Pre tratamiento mecánico

- a) Trituración mecánica: Molienda para reducción de partícula del tamaño, tiene un efecto mínimo en los rendimientos de la hidrólisis; pero en todos los casos supone altos costes energéticos y de capital (Chang *et al.*, 2000).

1.3.1.3. Pre tratamiento químico.

- a) Hidrólisis ácida: Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Siendo solamente usados a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los métodos industriales de hidrólisis ácida se agrupan en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados (10-30%), trabajan a bajas temperaturas (170-190°C) y mayor tiempo de residencia; y los que utilizan ácidos diluidos (1-5%), a temperaturas más altas (160-240°C), y tiempo de reacción de 6-12 segundos. (Galbe, 2002).
- b) Oxidación húmeda: Consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno a la biomasa, que está sumergida en el agua. Durante el pre tratamiento oxidativo puede tener lugar reacciones como sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales (Hon, 2001).

- c) Tratamientos con ozono: El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa. Se lleva a cabo a condiciones de presión y temperatura ambientales. La degradación es esencialmente limitada a atacar la lignina y hemicelulosa aunque la celulosa es afectada. (Sun y Cheng, 2002).
- d) Hidrolisis con álcalis: Se lleva a cabo con NaOH diluido donde se sumerge el material lignocelulósico, a 60°C por 24 horas, produciendo un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa, lo que la hace más accesible para enzimas y bacterias. Disoluciones de álcalis fuertes dan lugar a hidrolisis alcalina, degradación y descomposición de polisacáridos y rompimiento de radicales finales. (Fengel *et al.*, 1984).
- e) Tratamiento con solventes orgánicos: En el proceso, un compuesto orgánico o acuoso se mezcla con un ácido inorgánico (H₂SO₄), este se utiliza para romper el interior de la lignina y puentes de hemicelulosa. Se emplean disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, ácido orgánico como oxálico, acetilsalicílico y salicílico también puede ser utilizados como catalizadores en el proceso. A temperaturas altas (por encima de 185 °C), el uso de catalizadores es innecesario para la deslignificación (Sánchez y Cardona, 2005).

1.3.1.4. Pre tratamientos biológicos.

En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas o micro-organismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático.

- a) Tratamiento con hongos: Utiliza microorganismos como hongos de podredumbre marrón, blanco y suave se para degradar lignina y hemicelulosa en los materiales de desecho. La podredumbre marrón ataca la celulosa, mientras que la podredumbre blanca y suave ataca tanto la celulosa como la lignina. Hongos de pudrición blanca (*basidiomicetos*) son los más eficaces para el pre tratamiento biológico de materiales lignocelulósicos.

El principal inconveniente es que dichos hongos también consumen celulosa, lo que supone un problema para el rendimiento total del proceso. Además, la lentitud a la que se desarrollan estos procesos supone una desventaja adicional (Sun y Cheng, 2002).

- b) Tratamiento con bio-solventes orgánicos: Emplea solventes orgánicos y hongos, el primero para permitir la acción de hidrolisis en la hemicelulosa y el segundo para la descomposición de la red de lignina. Se han realizado estudios con etanol como solvente y podredumbre blanca para la degradación de lignina en madera, los hongos usados fueron *Ceriporiopsis subvermispora* y *Coriolus versicolor*. El pre tratamiento biológico puede ahorrar el 15% de la electricidad necesaria en la etanolisis, el etanol puede ser reutilizado y es amigable con el medio ambiente (Itoh *et al.*, 2003).

1.3.1.5. Pre tratamientos físico-químicos.

- a) Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX): El pre tratamiento con amoníaco se realiza con cargas de amoníaco en torno a 1:1 (amoníaco kg/kg peso biomasa seca) a temperaturas que van desde la temperatura ambiente con una duración de 10 a 60 días, a temperaturas de hasta 120°C, con una duración de varios minutos. También se da un aumento de seis veces la hidrolisis enzimática y un rendimiento de 2,5 veces el rendimiento a etanol después de este pre tratamiento (Alizadeh *et al.*, 2005).
- b) Explosión con CO₂: Se lleva a cabo con alta presión y altas temperaturas de hasta 200 °C, con una duración de varios minutos. Este pre tratamiento produce líquidos que pueden ser ácidos, estos ácidos hidrolizan especialmente la hemicelulosa. El CO₂ también se aplica como CO₂ súper crítico (35°C, 73 bares), este incrementa el rendimiento de glucosa en 50-70% de bagazo. Esto es probablemente causado por el aumento del tamaño de poros.
- c) Agua líquida a alta temperatura (LHW): En este proceso se somete la biomasa al efecto de agua caliente a una temperatura entre 170 – 230°C por un tiempo de 46 min. El objetivo de este pre tratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de

inhibidores. Para evitar la formación de inhibidores. Mantener el pH entre 4 y 7 minimiza la formación de monosacáridos y, por lo tanto, también la formación de productos de degradación que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico durante el pre tratamiento (Kohlmann *et al.*, 1995).

- d) Proceso de explosión por vapor con amoníaco (AFEX): Es un proceso similar a la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/ kg biomasa seca) a una temperatura en torno a los 90 °C, y un tiempo aproximado de 30 minutos. Transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión (Sun y Cheng, 2002).
- e) Explosión por vapor: La materia prima se somete a temperaturas entre 160-260.C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras), y químicas (despolimerización y rotura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables a controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (Duff y Murray, 1996).

1.3.1.6. Pre tratamiento de explosión con vapor.

El pre tratamiento por explosión por vapor (EV) es un pre tratamiento hidrotérmico en el que la biomasa es sometida a la acción de vapor saturado a relativamente alta presión durante un periodo determinado de tiempo (que puede variar desde unos segundos a varios minutos) tras el cual, el reactor se somete a una brusca descompresión. La EV combina efectos mecánicos con efectos químicos. Los efectos mecánicos están causados por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalladura que producen separación de las fibras, principalmente en las zonas de celulosa amorfa más débiles. El efecto químico se debe a que algunos grupos acetilos de las hemicelulosas son hidrolizados produciendo ácido acético, éste disminuye ligeramente el pH del agua y a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante la EV la lignina es redistribuida y parcialmente solubilizada (Palonen, 2004).

Estudios recientes han concluido que la solubilización parcial de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina son efectos, incluso más importantes que la ruptura de las fibras o modificación de la cristalinidad de la celulosa, para el aumento de la digestibilidad durante la hidrólisis.

La EV se ha mostrado como un método de pre tratamiento adecuado para aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático para un amplio rango de materias primas como chopo, eucalipto, ramón de olivo, bagazo de maíz (Öhgren *et al.*, 2006), bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998) y paja de trigo. Sin embargo, este pre tratamiento se muestra menos eficaz con las maderas blandas debido a su mayor contenido en lignina y menor número de grupos acetilo, lo que provoca que el proceso de autohidrólisis no sea tan efectivo. En el caso de las maderas blandas es necesario añadir un catalizador ácido, lo que implica mayor generación de productos tóxicos.

Entre las ventajas del pre tratamiento EV, cabe destacar la posibilidad de emplear tamaños relativamente grandes de partícula, evitar la adición de catalizadores ácidos (a excepción de las maderas blandas), la alta recuperación de azúcares, buenos rendimientos en la posterior HE y su viabilidad para ser implementado a escala comercial. No obstante, entre sus limitaciones se encuentran la parcial degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos que son potencialmente inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

1.3.1.7. Compuestos tóxicos generados en el pre tratamiento

Cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pre tratamiento (alta temperatura, alta presión, ambiente ácido) puede darse cierta degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos, generándose productos tóxicos que pueden afectar las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación. La naturaleza y concentración de los compuestos tóxicos generados durante el pre tratamiento dependen de la materia prima, del pre tratamiento utilizado, de las condiciones del mismo y de la utilización o no de catalizadores.

Atendiendo a su origen, los compuestos de degradación pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson *et al.*, 2000).

Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente. Como se muestra en la figura 1.10.

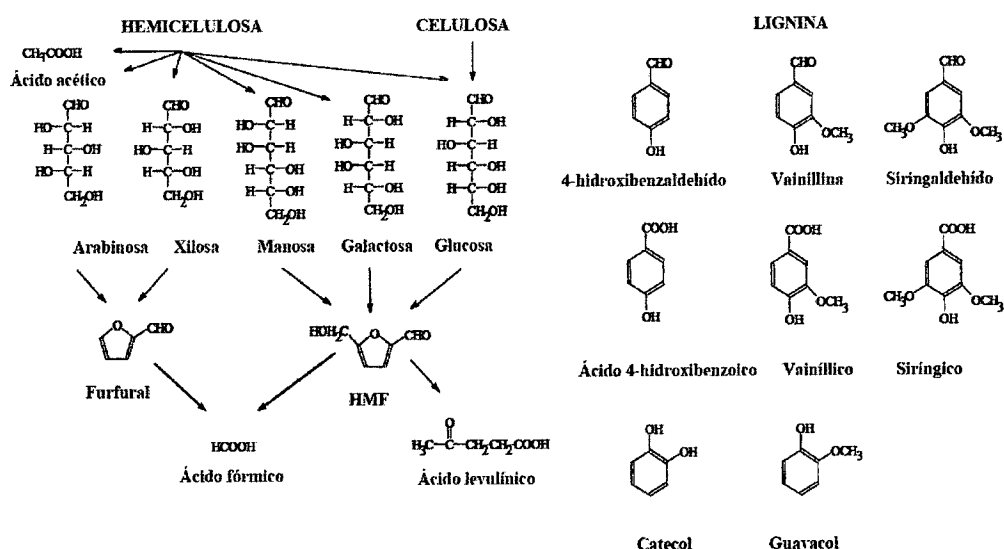


Figura 1.10. Principales productos de degradación originados en el pre tratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Fuente: (Palmqvist E., Hagerdal B. 2000).

Los ácidos alifáticos generados durante el pre tratamiento son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural e HMF (Almeida *et al.*, 2007).

El HMF también se genera durante el pre tratamiento un amplio rango de compuestos fenólicos como consecuencia de la solubilización de la lignina. Los derivados fenólicos más abundantes son el 4- vainillina, siringaldehído, hidroxibenzaldehído, ácido vainílico, acetosiringona y ácido sirínico. Los compuestos fenólicos causan una pérdida de integridad de la membrana celular y, como consecuencia, se reduce tanto el crecimiento celular como el consumo de azúcares (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

1.3.1.8. Tipos y Origen

Durante el pre tratamiento del material lignocelulósico no sólo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa sino que, debido a las altas temperaturas en las que se desarrollan estos pre

tratamientos, se originan una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima (maderas duras, blandas o herbáceas), del pre tratamiento utilizado, de las condiciones del proceso (temperatura y tiempo) y de la utilización o no de catalizadores ácidos. Los productos de degradación, que son potenciales inhibidores de la fermentación, pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos.

Como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pre tratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). A su vez, estos dos compuestos se pueden degradar a otros productos; el furfural puede degradarse a ácido fórmico, el HMF origina cantidades equimoleculares de ácidos fórmico y levulínico, además de estos dos ácidos alifáticos (fórmico y levulínico), se origina ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa.

Durante el pre tratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Se trata de un grupo de compuestos muy heterogéneo que se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y polímeros con una gran variedad de sustituyentes.

Entre ellos, se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos. Los fenoles originados en el pre tratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que existe una gran diferenciación de la lignina atendiendo al grupo taxonómico al que pertenezca la especie vegetal. Otros derivados fenólicos identificados han sido la vainillina y el ácido vainílico originados como consecuencia de la degradación de las unidades guayacilpropano de la lignina (Jönsson *et al.*, 1998).

Un tipo de compuestos (no incluidos en los tres grupos citados anteriormente) que se liberan durante el pre tratamiento son los extractivos. Entre ellos se encuentran diferentes tipos de resinas (ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras) y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc.).

Estos compuestos, a pesar de su baja concentración, también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos (Ekman, 2000).

1.3.1.9. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos

a) Furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Entre los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos se encuentran: reducción de la tasa específica de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica de etanol y disminución de la producción de biomasa. Los efectos producidos por el HMF son menores ya que la toxicidad mostrada por este compuesto sobre los microorganismos es menor que la del furfural son los mismos (Taherzadeh *et al.*, 2000b).

El efecto tóxico ocasionado por los furanos parece deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, o bien producir daños sobre la membrana plasmática.

Además, el furfural produce la inhibición de enzimas fermentativas. La inhibición que el furfural ejerce sobre el alcohol deshidrogenasa podría explicar la excreción de acetaldehído observada durante las primeras horas de la fermentación en presencia de este derivado del furano. El furfural y el HMF son metabolizados tanto por bacterias como levaduras (Palmqvist *et al.*, 1998).

b) Ácidos alifáticos.

Aunque está bien documentado en la bibliografía que los ácidos alifáticos producen descenso del rendimiento en etanol y disminución de la producción de biomasa, el mecanismo por el que se produce la inhibición no está completamente aclarado. (Pampulha, 1989).

Uno de los mecanismos propuesto para explicar el efecto inhibitorio de los ácidos alifáticos es la teoría del desacoplamiento. Según esta, el efecto tóxico depende de los ácidos y del pH del medio. Únicamente la forma no disociada de los ácidos penetra en la célula por difusión, debido al mayor pH intracelular se disocia, provocando un descenso del pH. Cuando la concentración de ácido es suficientemente alta, origina la acidificación del citoplasma y la posterior muerte celular (Imai, 1995).

Aunque no se conoce con certeza el mecanismo de inhibición de los ácidos alifáticos, el efecto tóxico mostrado por estos compuestos puede deberse tanto al desacoplamiento como al efecto inhibitorio. Probablemente, el efecto de los ácidos alifáticos de cadena corta también se deba a un efecto directo de estos compuestos sobre la integridad de la membrana. La inserción de compuestos alifáticos en la membrana puede alterar su estructura e hidrofobicidad, produciendo un aumento de la permeabilidad de la misma y afectar a su función de barrera selectiva. (Heipieper *et al.*, 1994).

c) Compuestos fenólicos.

El efecto tóxico de los aldehídos aromáticos puede deberse a una interacción con determinadas zonas hidrofóbicas de las células y causar pérdida de la integridad de la membrana afectando a su capacidad de actuar como una barrera selectiva, se demostró que el efecto tóxico de los alcoholes aromáticos se debía al daño ocasionado por estos alcoholes sobre la membrana plasmática. El efecto inhibitorio mostrado por los ácidos aromáticos puede basarse en mecanismos semejantes al de los ácidos alifáticos descritos anteriormente (Larsson, 2000).

Al igual que con el furfural e HMF, existen datos en la bibliografía que demuestran la capacidad de determinados microorganismos, tanto bacterias como *Z. mobilis*, como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Pichia* y *Cándida* de metabolizar los aldehídos aromáticos. (Delnieri *et al.*, 1999).

1.3.2. Hidrolisis enzimática

La Hidrolisis Enzimática es el proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa, el uso del pre tratamiento, facilita el desarrollo de esta etapa. Cabe destacar que en la mayoría de procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa.

La hidrólisis enzimática (HE) constituye una de las etapas limitantes del proceso global de producción de etanol. Las principales dificultades al realizar la HE de la biomasa lignocelulósica están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas actualmente disponibles, lo que conlleva el empleo de altas dosis de celulasas, y con la propia naturaleza de la lignocelulosa. Es por este último inconveniente que el pre

tratamiento es una etapa crucial en los procesos de producción de etanol mediante HE. Además, el coste de producción enzimática representa una parte significativa del coste total del proceso. En un proceso de producción de etanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), la producción enzimática puede llegar a constituir el 50% del coste total. Es por ello, que en la última década se han realizado numerosos esfuerzos para disminuir el coste de los mismos. Por iniciativa del Departamento de Energía de los Estados Unidos; Genencor Internacional y Novozymes Inc., los dos principales productores mundiales de enzimas, están colaborando con el objetivo de lograr una reducción significativa (10 veces) del coste actual del catalizador. (Alfani *et al.*, 2000).

Las celulasas pertenecen principalmente a tres grupos de enzimas conocidas como endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas (BG). Las endoglucanasas (EGs) actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces β -(1 \rightarrow 4) centrales de la cadena de celulosa creando extremos libres; las celobiohidrolasas (CBHs), también llamadas exoglucanasas, actúan sobre los extremos de las cadenas liberando monómeros de glucosa de bajo peso molecular; las β -glucosidasas (BGs), son las encargadas de hidrolizar las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa. (Zacchi G., 2006b).

Existen microorganismos que las producen en cantidades mayores, tales como: *Escherichia coli*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter mathranii*. Debido a la naturaleza diversa de la hemicelulosa, las hemicelulasas incluyen un mayor número de grupos de enzimas con actividades enzimáticas específicas para cada tipo de enlace. Incluyen enzimas que rompen la cadena principal, como las xilanasas y enzimas que rompen las ramificaciones como las furanosidasas, glucuronosidasas y β -galactosidasas (Saha, 2003).

1.3.3. Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso ampliamente utilizado por el hombre desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza, es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el

almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. La conversión estequiométrica de la glucosa a etanol es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan altas ya que las levaduras derivan cierta parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento. (Berlín *et al.*, 2005).

1.3.3.1. Fermentación de hexosas

Las hexosas son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de seis átomos de carbono. Su fórmula general es $C_6H_{12}O_6$. Su principal función es producir energía. Las más importantes desde el punto de vista biológico son: glucosa, galactosa y fructosa.

1.3.3.2. Fermentación de pentosas

La interconversión de la pentosa y la hexosa tiene lugar por la vía de la pentosa-fosfato. Esta vía permite la síntesis de la hexosa por bacterias que crecen sobre la pentosa, y también permite la síntesis de otros dos azúcares. La fracción de pentosas en la hemicelulosa consiste principalmente de xilosas, pero depende del origen de la materia prima. Han sido estudiados diferentes microorganismos para fermentación, entre ellos bacterias, levaduras y hongos.

El microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede usar todo tipo de hexosas y produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Además, si se emplea en procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa, muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pre tratamiento. No obstante, *S. cerevisiae* presenta una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, que también están presentes en los materiales lignocelulósicos. De ahí el interés de utilizar en este proceso microorganismos capaces de fermentar de forma eficiente todo tipo de azúcares.

La bacteria *Zymomonas mobilis* que transforma la glucosa en etanol con un rendimiento del 5 al 10% mayor que la mayoría de las levaduras son hoy objeto de estudio (Mielenz, 2001).

1.3.3.3. Fermentación de la Xilosa

Los residuos agrícolas, entre los que se encuentra el bagazo de caña de azúcar contienen alrededor de un 25% de azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa. Es por ello que la utilización de la xilosa es esencial para una eficiente y rentable conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol. Mientras la fermentación de la glucosa puede llevarse a cabo de forma eficiente por numerosos tipos de microorganismos, la fermentación de la xilosa presenta algunas limitaciones. Únicamente bacterias entéricas y algunas levaduras como *Cándida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *P. stipitis* son capaces de fermentar la xilosa a etanol, pero con rendimientos relativamente bajos. Además, las levaduras fermentadoras de xilosa no toleran altas concentraciones de etanol, requieren condiciones microaerófilas para su crecimiento y son muy sensibles a los inhibidores y a los cambios de pH (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

Actualmente no existen microorganismos que presenten todas las características deseables para la fermentación eficiente de los azúcares procedentes de los materiales lignocelulósicos (fermentación de hexosas y pentosas, altos rendimientos, alta productividad, tolerancia al etanol y a los inhibidores). Puesto que la utilización de forma eficiente de todos los azúcares hemicelulósicos es clave para reducir el coste de la producción de etanol, se están obteniendo microorganismos fermentadores de xilosa mediante técnicas de ingeniería genética; ya sea por la introducción de los genes relacionados con la producción de etanol en las bacterias entéricas como *E. coli*, o por la introducción de los genes de la ruta de la fermentación de las pentosas en microorganismos productores de etanol como la levadura *S. cerevisiae* o la bacteria etanológica *Z. mobilis*.

También pueden fermentar la xilosa cepas recombinantes de *Z. mobilis* que han sido genéticamente modificadas mediante la introducción de los genes del metabolismo de la xilosa de *E. coli*, ha sido transformada con el fin de desviar los flujos del carbono hacia la producción de etanol. Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos que se

han realizado en los últimos años para el desarrollo de estos microorganismos, las alternativas bacterianas para la producción de etanol no están todavía comercializadas. (Patle y Lal, 2008).

1.3.4. Utilización de levaduras termo tolerantes en los procesos de obtención de etanol

La producción de etanol es un proceso exergónico. En un proceso industrial de producción de etanol, el empleo de levaduras termotolerantes evitaría problemas asociados con el sobrecalentamiento de los fermentadores y evitaría el enfriamiento con la consiguiente reducción de los costes de producción y las paradas debidas a este sobrecalentamiento que a menudo se producen en países donde la temperatura ambiente es alta y el enfriamiento de los fermentadores no es posible. Otras ventajas de la utilización de altas temperaturas en el proceso de producción de etanol son el aumento de la productividad, la reducción de los riesgos de contaminación y una mayor facilidad en la recuperación del producto (Ghose *et al.*, 1984).

1.3.4.1. Uso de Hongos

Un substrato tan complejo como la biomasa lignocelulósica no puede ser completamente hidrolizado por una única enzima. La hidrólisis enzimática de celulosa es resultado de la acción de por lo menos tres enzimas: celulasas que hidrolizan la celobiosa, y 1,4- β -glicosidasa, que hidroliza la celobiosa a glucosa. Aunque un gran número de microorganismos sea capaz de degradar la celulosa, solamente pocos producen cantidades significantes de enzimas celulares libres capaces de degradar este tipo de biomasa completamente. Los hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Phanerochate chrysosporium* y *Humicola grisea* producen y secretan altas concentraciones de enzimas incluyendo celulasas, ligninasas y amilasas. (Zhang *et al.*, 2006).

1.3.4.2. Uso de Bacterias Termofilicas

Uno de los microorganismos más estudiado para la producción de etanol es la bacteria Gram negativa (*Z. mobilis*), ésta presenta mayores tasas específicas de consumo de azúcares y velocidades de producción de etanol que las levaduras.

Además, *Z. mobilis* produce menos biomasa y presenta mayor tolerancia hacia el etanol (hasta 120 g/l) *Z. mobilis* presenta altos rendimientos y productividades de etanol debido a que este microorganismo metaboliza la glucosa anaeróbicamente mediante la vía de *Entner- Doudoroff* (ED) en lugar de la de *Embden- Meyerhof Parnas* (EMP) (Dien *et al.*, 2003).

1.3.4.3. Zymomonas Mobilis

1.3.4.3.1. Historia

Barker y Hiller, (1912) describieron por primera vez a la bacteria responsable de la enfermedad de la sidra, además se percataron que una sidra enferma tenía las características de la aparición de espuma y abundante formación de gas, presentando cambios en su aroma, sabor, reducción de su dulzura, y el desarrollo de una marcada turbidez. Ellos aislaron y purificaron la bacteria pero no le dieron un registro taxonómico en latín al nuevo microorganismo. Es por eso que el descubrimiento de *Zymomonas mobilis* se le atribuye a Linder quien en 1924 aisló dicha bacteria del pulque en México. En 1951 Millis aisló varias bacterias de sidras y jugo de pera parecida a las aisladas por Barker. Él demostró claramente que el microorganismo causante de la contaminación de la sidra era *Zymomonas mobilis*; llegando a la conclusión que los factores que propician la enfermedad de la sidra son: La baja acidez de la sidra de manzana y la alta temperatura de almacenamiento (Swings y De Ley, 1977).

Como ya se ha mencionado, desde siempre el microorganismo común para la producción de etanol ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pero en los años 50 empezó a adquirir gran popularidad la bacteria *Zymomonas mobilis* después de que Gibbs y Demos descubrieran que el catabolismo anaerobio de la glucosa se lleva a cabo mediante la ruta de *Entner-Doudoroff*. Esta es una ruta limitada a unas cuantas bacterias Gram negativas con metabolismo oxidativo. Su función principal es aportar piruvato a la célula. Los microorganismos más representativos que llevan a cabo el metabolismo de los carbohidratos por esta vía son: *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, y *Pseudomona aeruginosa*. Las enzimas glicolíticas y las enzimas de *Entner Doudoroff* no son inhibidas por etanol, la vía es directamente inhibida por la pérdida de cofactores y coenzimas (García *et al.*, 2003).

La bacteria *Zymomonas mobilis* es el primer ejemplo de un organismo anaerobio que usa una ruta utilizada por bacterias aerobias estrictas. *Zymomonas mobilis* se encuentra en zonas tropicales de América, África, Asia, y países subtropicales, donde es utilizada para la fabricación de bebidas alcohólicas. Ha sido aislada del jugo de caña de azúcar en Brasil e Islas Fiji, del vino de palma en África central, del grano de cocoa, de la miel en maduración, de la cerveza, y del pulque entre otros.

1.3.4.3.2. Especie

Existen varias cepas del género *Zymomonas*, Swing y De Ley en 1977 examinaron más de 40 cepas encontradas en Zaire, México, Indonesia, y Gran Bretaña por métodos taxonómicos. Llegaron a la conclusión de que todas las cepas de *Zymomonas* están constituidas por: Una especie: *Zymomonas mobilis* y dos subespecies:

- ✓ *Zymomonas mobilis* subespecie *mobilis*.
- ✓ *Zymomonas mobilis* subespecie *pomaceae*.

1.3.4.3.3. Características

La bacteria *Zymomonas mobilis*, es un microorganismo en forma de vaina de 1.0-2.0 x 4.0-5.0µm, con extremos redondeados, Gram-negativa, anaerobia facultativa, es una de las pocas bacterias que degradan glucosa por la vía de *Entner-Doudoroff* (vía homoetanólica para la producción de etanol); no forma esporas, no tiene cápsula, lípidos intracelulares o glucógeno, es móvil, se le encuentra en parejas, su crecimiento es viscoso, blanco cremoso, lento y limitado en medio sólido; es poseedora de una fisiología única que le permite tener un alto rendimiento (Glucosa= 0.51) y productividad de etanol (1.6 g/L de etanol, a partir de 120g/L de glucosa). El 50% de la célula comprende el total de proteínas que contiene. Tolerancia temperaturas de hasta 40°C y 127 g/L de etanol, 300 g/L de glucosa y hasta 400 g/L de glucosa (en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*) (DiMarco y Romano, 1985).

El crecimiento celular se produce a un pH que fluctúa entre 3,5 y 7,5, aunque el rango óptimo es de entre 5 a 7 muchas cepas crecen a pH 3,5 y 4, como ocurre también con bacterias acético, que tienen la capacidad Crecimiento a un pH entre 4 y 4,5. (Erzinger y Vitolo, 2006).

1.3.4.3.4. Sustratos

Zymomonas mobilis no solo produce etanol, ya que el producto que se puede obtener depende de la fuente de carbono. Si el sustrato es glucosa o fructosa, produce etanol y CO₂, si el sustrato es glucosa y fructosa produce además sorbitol; y si el sustrato es sacarosa produce levanas, sorbitol, etanol y CO₂. *Zymomonas mobilis* es una excelente productora de etanol, además de ser capaz de producir otros metabolitos a partir de un proceso simple reduciéndose así el costo para la obtención de cada subproducto, pero esto depende del sustrato que se utilice en el medio de cultivo. (Di Marco y Romano, 1985).

De manera teórica se cree que las enzimas catabólicas o las velocidades metabólicas determinan la velocidad de consumo de los monómeros. Debido a esto es la actividad catabólica y no la hidrólisis de la sacarosa la responsable de limitar la velocidad de formación de etanol. La independencia de la hidrólisis de la sacarosa y el transporte de los azúcares, de la velocidad de consumo de los mismos y de los diferentes mecanismos de control que llevan a cabo las enzimas durante la fosforilación inicial, pueden dirigir el metabolismo por el cual hay formación de fructuosa, sorbitol, oligosacáridos, ácido glucónico y enzimas cuando se encuentra en presencia de oxígeno parte del etanol se oxida produciéndose ácido acético. (Jones *et al.*, 1991).

En la actualidad se ha modificado genéticamente a la bacteria para poder utilizar otros sustratos como: lignocelulosa, almidón, celulosa, hemicelulosa, xilosa, arabinosa, lignina, melazas, vinazas, azúcar de caña, almidón de trigo, almidón de maíz, papa, sorgo, yuca, fécula, arroz integral, cebada sin cáscara, cualquier producto de uso vegetal y residuos de cultivos. (Balat, 2009).

1.3.4.4. Ruta Entner-Doudoroff (E-D)

Esta ruta glicólica existe en microorganismos fuertemente aerobios, como las *pseudomonas*. Se denomina por su intermediario característico como la ruta de 2-ceto-3 desoxi-6-osfogluconato. La glucosa primero se oxida y después se desagra da en piruvato. El rendimiento neto de esta secuencia de reacciones es:



La cantidad de energía que se produce en la ruta ED es relativamente pobre, dando un mol de ATP por mol de glucosa procesada.

a) Ventajas de la *Zymomonas mobilis*:

Algunas de las ventajas de *Zymomonas mobilis* sobre las levaduras son:

- Velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de etanol elevadas.
- Mayor productividad volumétrica de etanol.
- Rendimiento de etanol superior y rendimiento de biomasa inferior.
- No necesita aporte de oxígeno.

b) Desventaja de la *Zymomonas mobilis*:

- Trabaja con un rango pequeño de carbono como glucosa, fructosa y sacarosa.
- Producción de subproductos como acetona, acetaldehído, glicerol, ácido láctico, y ácido acético.

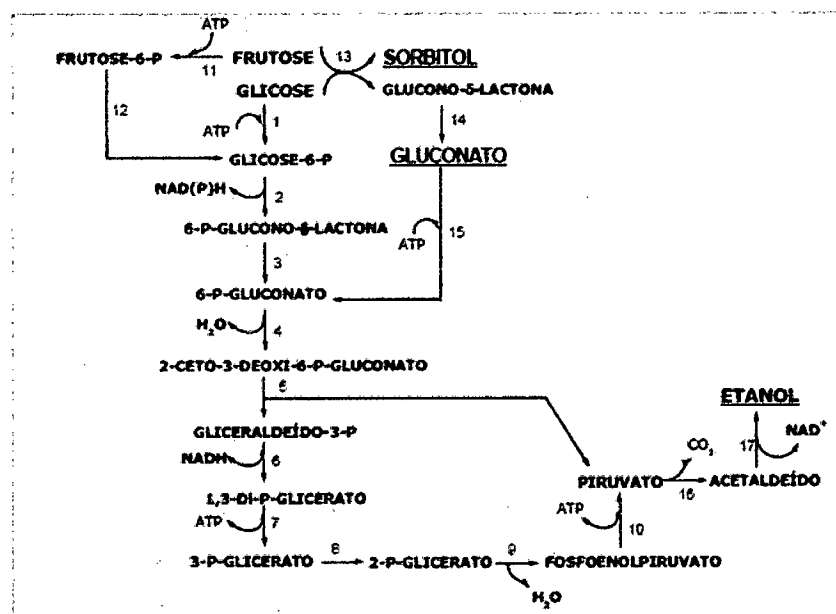


Figura 1.11. Vía metabólica de formación de productos por *Zymomonas mobilis*.

Fuente: (Sprenger, 1996).

1.4. Integración de las etapas de proceso.

1.4.1. Hidrólisis y fermentación separadas (HFS)

La configuración comúnmente empleada en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica implica un proceso secuencial en el que la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa se realizan en dos reactores diferentes. En este proceso, denominado hidrólisis y fermentación separadas (HFS), la fracción rica en celulosa es primeramente hidrolizada a glucosa. Una vez completada la hidrólisis y separado el residuo de lignina, la glucosa resultante es fermentada y convertida a etanol.

La utilización de un medio líquido rico en glucosa hace posible la recirculación de los microorganismos tras la fermentación. La principal ventaja en este tipo de procesos es que cada etapa puede ser llevada a cabo en sus condiciones óptimas de pH y temperatura. Esto permite realizar la hidrólisis a temperaturas alrededor de 50 °C, donde se encuentra el óptimo de actividad celulítica en la mayoría de celulasas y β -glucosidasas fúngicas, y a un pH óptimo entre 4-5. Posteriormente se realiza la fermentación a temperaturas entre 30-37 °C, donde se encuentra el óptimo para la mayoría de microorganismos etanológicos. La principal desventaja en la HFS se debe a que la acumulación de la glucosa y celobiosa en la etapa de hidrólisis inhibe a las celulasas implicadas en el proceso, obteniéndose, por lo tanto, bajos rendimientos de sacarificación. (Jorgensen *et al.*, 2007).

1.4.2. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

En el proceso de SFS la glucosa liberada por acción de las celulasas durante la hidrólisis es directamente metabolizada a etanol por las levaduras. Esta continua eliminación de la glucosa del medio minimiza la inhibición por producto final sobre la actividad de las celulasas lo que se refleja en rendimientos de hidrólisis más altos, necesidad de menores dosis de enzima, reducción del tiempo total de proceso y productividades de etanol más altas (Alfani *et al.*, 2000).

El proceso de SFS se presenta como un método viable y eficiente para la producción de etanol celulósico ya que puede ser empleado con gran variedad de materias primas y con diferentes tecnologías de pre tratamiento. No obstante también muestra algunos

inconvenientes, ya que las condiciones óptimas de pH y temperatura en las etapas de hidrólisis y fermentación son diferentes y se deben fijar unas condiciones de compromiso entre ambas.

El pH óptimo para la hidrólisis enzimática se encuentra alrededor de 4,8. En cambio, el pH para la fermentación, dependiendo del microorganismo, suele ser 5 o superior. En cuanto a la temperatura óptima, la de la hidrólisis se encuentra alrededor de 50 °C mientras que la mayoría de microorganismos fermentadores tiene su óptimo de temperatura entre los 30-37. En este contexto, el empleo de levaduras termo tolerantes como *Kluyveromyces marxianus* capaces de crecer y fermentar a temperaturas superiores a 40 °C, más cercanas a la temperatura óptima de la hidrólisis, aparece como una alternativa muy prometedora. Independientemente de la temperatura a la que se realiza la SFS, la concentración de sólidos en el proceso debe ser tan elevada como sea posible para asegurar altas concentraciones de azúcares que permitan obtener elevadas concentraciones finales de etanol en el medio. Cuanto mayor es la concentración de sustrato durante la SFS, mayor concentración de etanol potencial puede obtenerse, y por lo tanto es necesaria menos energía en los posteriores pasos de destilación y evaporación. (Rosgaard *et al.*, 2007).

Mediante pre sacarificación se produce una mejor agitación del medio, una distribución uniforme de los microorganismos y enzimas, así como un mejor control del pH y la temperatura. La pre hidrólisis muestra otras ventajas ya que al poder realizarse a temperaturas más altas, debido a la ausencia de levaduras en el medio, se mejora la tasa de hidrólisis durante la misma (Laopaiboon *et al.*, 2007).

1.4.3. Sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS)

En un proceso en el que las fracciones sólida y líquida se fermentan por separado, se podrían optimizar las condiciones para la fermentación de la glucosa o xilosa en cada una de ellas. Sin embargo, al emplear el material pre tratado completo (MPC), ambos azúcares están presentes en el medio y deben ser fermentados simultáneamente, la presencia de glucosa en el medio inhibe la incorporación de la xilosa al interior de la célula, por lo que los niveles de glucosa en el medio deben mantenerse bajos para una cofermentación eficiente.

Así pues, los procesos en semicontinuo en los que el sustrato se añade por pulsos ayudan a mantener bajas las concentraciones de glucosa a lo largo del proceso de SCFS favoreciendo la incorporación de la xilosa (Öhgren *et al.*, 2006b).

En el proceso de SCFS la acumulación de glucosa en el medio es menor que en el caso de HFS, ya que según se va produciendo en la etapa de hidrólisis es transformada a etanol por el microorganismo, lo que resulta favorable para la fermentación de la xilosa. Además, puesto que los azúcares hemicelulósicos también parecen tener un efecto inhibitorio sobre las celulasas, el consumo de la xilosa en un proceso de SCFS implicará mayores rendimientos de HE de la celulosa, aumentando aún más la eficiencia global del proceso de SCFS.

1.4.4. Bioproceso consolidado

El bioproceso consolidado (BPC) conlleva la combinación de las 4 reacciones biológicas necesarias para la transformación de la lignocelulosa a etanol en un único reactor: producción de las enzimas (celulasas y hemicelulasas), hidrólisis del material pre tratado a azúcares, fermentación de las hexosas y fermentación de las pentosas. Para la consecución de dicho proceso se necesita un único microorganismo, o mezcla de éstos, capaces de hidrolizar y fermentar la biomasa pre tratada sin adición de enzimas exógenas. Entre los microorganismos capaces de degradar la celulosa, las bacterias celulolíticas del género *Clostridium* y enzimas del género de *zymomonas mobilis* han sido las mejor estudiadas y caracterizadas. Estas bacterias digieren la celulosa mediante un complejo enzimático extracelular llamado celulosoma. Las celulosomas son capaces de hidrolizar tanto la parte amorfa como la parte cristalina de la celulosa. (Qteros, 2009).

El bioproceso consolidado es uno de los objetivos incluidos en la Agenda de Investigación Estratégica de la Plataforma Europea Química Sostenible (SUSCHEM). En el siguiente cuadro 1.5 se resumen las principales características de los diferentes procesos detallados en el presente capítulo.

Cuadro 1.5. Descripción de las diferentes configuraciones de proceso con diferentes niveles de integración.

	HFS	SFS	SCFS	BPC
CARACTERÍSTICAS	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa. La glucosa resultante es convertida a etanol en el paso posterior de fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan la celulosa y el microorganismo convierte simultáneamente la glucosa resultante a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan la celulosa y simultáneamente el microorganismo convierte la glucosa resultante a etanol. - La xilosa solubilizada en el hidrolizado es también fermentada a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conversión de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos a etanol por un único microorganismo o mezcla de éstos
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Condiciones óptimas para cada paso. - Posibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> - Amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para este tipo de procesos. - Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima. - Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se necesita la adición de enzimas para realizar la hidrólisis.
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso en dos pasos con el consiguiente aumento de costes que ello supone. - Inhibición por producto final durante la hidrólisis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. - No hay fermentación de las pentosas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los microorganismos fermentadores de pentosas no están ampliamente desarrollados. - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> - No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente proceso.

Fuente: (Qteros, 2009).

1.5. Destilación

1.5.1. Concepto de Destilación.

Es aquella operación en la que la vaporización de una mezcla produce una fase vapor, que contiene uno de los constituyentes en estado casi puro, el objetivo general de la destilación consiste en separar compuestos que contienen diferentes presiones de vapor a una temperatura determinada.

El término destilación se refiere a la separación física de una mezcla en dos o más fracciones que tiene distintos puntos de ebullición. (Holland, 1992).

La exigencia básica para la separación de los componentes de una mezcla por destilación es que la composición del vapor sea diferente a la composición de líquido con el cual se encuentra en equilibrio. Si la composición del vapor es la misma que la del líquido. Teóricamente, la destilación nunca producirá la separación de un componente puro, aunque prácticamente el producto pueda obtenerse con un grado de pureza garantizado económicamente (Badger, 1964).

1.5.2. Métodos de Destilación.

Existen dos métodos de destilación por carga.

- ✓ El primero se basa en la producción de vapor mediante la ebullición de la mezcla líquida que se desea separar y la consecuente condensación de estos sin permitir que el líquido retorne al calderín. Es decir, no hay reflujo externo.
- ✓ El segundo se basa en el retorno de una parte del condensado al tope de la columna en unas condiciones tales que el líquido que retorna (reflujo externo) se pone en íntimo contacto con los vapores que ascienden hacia el condensador (Kister, 1999).

1.5.3. Destilación sencilla

En la destilación diferencial o destilación sencilla, el vapor que se genera al hervir el líquido se va separando a medida que se forma el condensado. Las destilaciones de laboratorio que se efectúan sin columnas de reflujo corresponden a este tipo de destilación. Se muestra en la figura 1.12.

La destilación diferencial es también conocida como destilación por lotes que se caracteriza por tener una sola etapa teórica, por tanto es imposible lograr una separación razonable; dicha destilación se puede utilizar para: Separar mezclas de líquidos miscibles de forma eficiente siempre y cuando los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla difieran al menos en 100°C, purificar un compuesto líquido, determinar el punto de ebullición normal de un líquido (Badger, 1964).

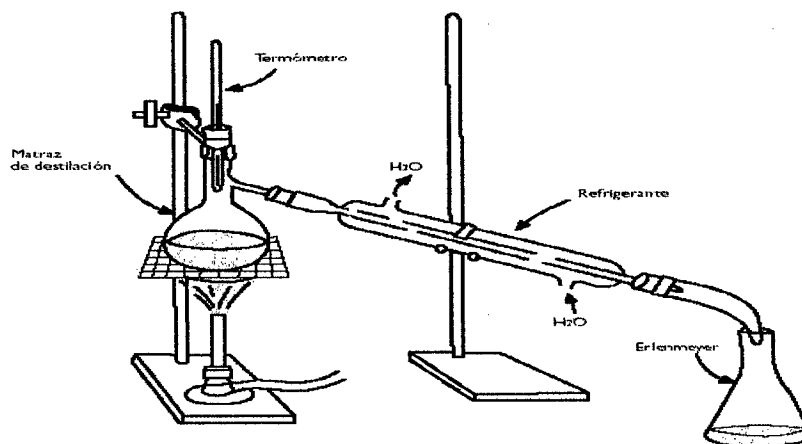


Figura 1.12. Esquema de la destilación sencilla.

Fuente: (Chopey, 1986)

1.5.4. Destilación fraccionada

Según Chopey, (1986), En este tipo de destilación los ciclos de evaporación y condensación se repiten varias veces a lo largo de la columna de fraccionamiento. Es un tipo de destilación mucho más eficiente que la destilación sencilla y permite separar sustancias con puntos de ebullición muy próximos. En la figura 1.13 se dispone un esquema de rectificación intermitente. El equipo en esencia es similar al utilizado para realizar una destilación sencilla con la novedad de que entre el matraz de destilación y la cabeza de destilación se coloca una columna de fraccionamiento. Las columnas de fraccionamiento pueden ser de distintos tipos; pero a nivel de laboratorio consisten en un tubo de vidrio con abultamientos o un relleno en su interior donde se producen los sucesivos ciclos de evaporación y condensación de la mezcla a purificar por destilación.

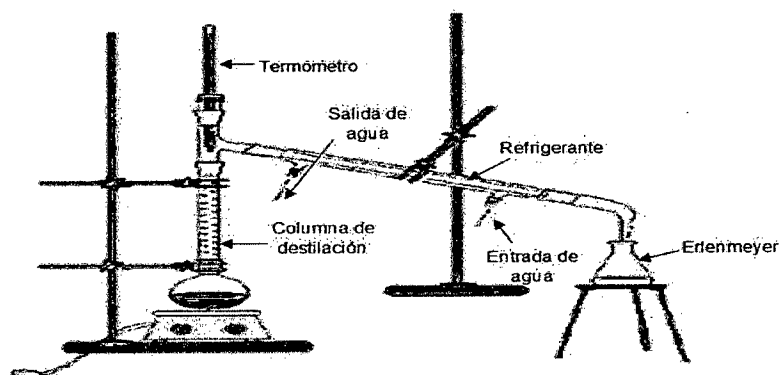


Figura 1.13. Esquema de rectificación intermitente.

Fuente: (Chopey, 1986).

1.6. Subproducto de la fermentación y destilación

1.6.1. Vinaza

Según Villanueva, (1997), la vinaza es el residuo que queda después de extraído el alcohol, sirven para abonar los campos de cultivo. La composición de la vinaza se presenta en el cuadro 1.6.

Cuadro 1.6. Principales componentes de la vinaza.

Componente	%
Agua	93.79
Sulfato	0.63
Fósforo	0.01
Nitrógeno	0.10
Potasio	0.76
Calcio	0.06
Materia orgánica	3.50

Fuente: (Villanueva, 1997).

1.6.2. Aceite fusel (fusel *oil*)

Según Villanueva, (1997), el aceite fusel es una capa aceitosa que se obtiene al final de la fermentación de los diferentes sustratos con levaduras, bacterias y después de destilado el alcohol etílico. El aceite fusel, es una fracción de alto punto de ebullición (90°C a 150°C) y está formado por algunos componentes entre los que encontramos en este aceite son: butanol, propanol, alcohol amílico, aldehídos y ésteres. (Krestzschmar, 1961).

1.7. Impurezas Presentes en Alcoholes Destilados.

Según Krestzschmar, (1961), las impurezas comúnmente presentes en destilados son: ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores.

1.7.1. Ácidos

Dentro de los ácidos formados en la fermentación alcohólica predomina el acético, y en menores proporciones el sulfurosos y el sulfhídrico; en cuanto al ácido acético, lo obtienen a partir del aduje pirúvico. Una pequeña parte de él se esterifica con etanol

para formar acetato de etilo cuyo descriptor es el aroma a pegamento. (Hengstebeck 1964). También es conveniente considerar al ácido láctico. Las cantidades obtenidas de este compuesto son mucho menores (entorno a 0.5 g/L). Igualmente se obtiene a partir del ácido pirúvico. Una pequeña parte de él esterifica con etanol para formar lactato de etilo cuyo descriptor es el aroma a café.

1.7.2. Aldehídos

Quesada, (1996), sostiene que los aldehídos derivan de la oxidación parcial de los alcoholes primarios o de su deshidrogenación. De allí surgió la palabra aldehído que quiere decir alcohol deshidrogenado. Dentro de la variedad de aldehídos formados en la fermentación alcohólica el que se produce en mayor proporción es el acetaldehído. El acetaldehído es un líquido incoloro, inflamable, olor a fruta. Es tóxico, miscible con el agua, alcohol, éter y acetona. El furfural es un líquido aceitoso de color amarillo tenue, oscurece hacia rojo - bronce al ser expuesto al ambiente, olor a almendra. Propiedades fisicoquímicas generales de los aldehídos:

- ✓ Densidad generalmente inferior a la del agua.
- ✓ Con excepción de formaldehído que es un gas, los aldehídos son líquidos incoloros.
- ✓ Los aldehídos más simples tienen olores penetrantes y a medida que aumenta su peso molecular el olor se torna más fragante.

El acetaldehído es un producto intermedio de la fermentación alcohólica y la mayor parte se reduce a etanol durante este proceso. Por otro lados la mayor parte de acetaldehído presente en las soluciones alcohólicas terminada la etapa de fermentación es el resultado de la oxidación microbiana del etanol en condiciones aeróbicas. Como producto intermedio de la formación bacteriana de ácido acético, el acetaldehído se puede acumular incluso en condiciones de baja concentración de oxígeno.

1.7.3. Ésteres

Hengstebeck, (1964), reporta que entre los ésteres formados durante la fermentación alcohólica el más importante es el acetato de etilo, existiendo algunos homólogos superiores producto del alcohol etílico; los ésteres de bajo peso molecular son líquidos y se acostumbra a utilizar como disolventes, especialmente los acetatos de alcoholes metílico, etílico y butílico.

Muchos ésteres de bajo peso molecular tiene olores característicos a fruta: plátano (acetato isoamílico), ron (propionato de isobutilo) y piña (butirato de butilo). Estos ésteres se utilizan en la fabricación de aromas y perfumes sintéticos. Los ésteres son sales alcohólicas, tanto de ácidos inorgánicos como de ácidos orgánicos. Los ésteres líquidos se han empleado como sustitutos de esencias de algunas frutas debido a su olor agradable.

Según Rankine, (1995) los ésteres de mayor proporción en una fermentación se producen a partir de alcohol etílico. Su formación y origen se da en las levaduras y bacterias.

1.7.4. Alcoholes superiores

Según Presscott, (1962), los alcoholes superiores son aquellos alcoholes que existen en proporciones muy pequeñas y ejercen influencia en el aroma, los alcoholes superiores no son obtenidos mediante la cinética de la fermentación alcohólica pero sí durante su transcurso. Es decir la ruta bioquímica esta predispuesta a obtener alcohol etílico; pero la presencia de otros metabolitos condiciona la presencia de alcoholes superiores.

La proporción en que comúnmente se encuentran estas alcoholes está en el rango de 0.2 a 0.5 % sobre el alcohol etílico. Se obtienen mediante desaminación de aminoácidos por parte de las levaduras y bacterias con el fin de obtener nitrógeno amoniacal para su consumo o para formar otros aminoácidos consumibles. A partir de una concentración global de unos 300 ppm comienzan a ser totalmente desfavorables organolépticamente.

1.7.4.1. Alcohol metílico ($\text{CH}_3\text{-OH}$)

De acuerdo a Reusch, (1979), históricamente obtenido por pirólisis de la madera, de allí su nombre de alcohol de madera. El metanol es un líquido incoloro inflamable y miscible con el agua, en todas las proporciones, y con la mayoría de los disolventes orgánicos.

Durante la elaboración de bebida alcohólica la formación de metanol se realiza a partir de pectinas, debido a la existencia de enzimas pectinolíticas que las degradan y que están presentes en las materias primas con las uvas o en las levaduras (pectinmetilesterasas). La cantidad de metanol liberado depende del contenido pectínico y de la cantidad y actividad de las pectinasas. Así mismo se considera que

las bebidas alcohólicas que se fermentan a partir de mosto sin filtrar el contenido de metanol es mayor, por ejemplo el vino tinto tiene mayor contenido de metanol que el vino blanco.

1.7.4.2. Alcohol Isopropílico

El alcohol Isopropílico tiene la fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ y de peso molecular de 60.09. Es completamente miscible al agua y con todos los disolventes ordinarios oxigenados e hidrocarburos. Forma con el agua una mezcla de punto de ebullición constante que contiene 92.32 % de alcohol en volumen (87.7% en peso). Esta mezcla tiene las siguientes características físicas: temperatura de ebullición 80.2 °C; viscosidad a 25 °C. Los agentes oxidantes energéticos convierten el alcohol Isopropílico en acetona y si la oxidación continúa se forma dióxido de carbono y ácido acético (Reusch, 1979).

1.7.4.3. Alcohol Isobutílico

Prescott, (1962) ha demostrado que el alcohol Isobutílico se puede formar por la acción de las levaduras y bacterias sobre la valina; además de ser un líquido incoloro, leve olor dulce a humedad, se usa en la fabricación de sustancias químicas, saborizantes y solventes.

1.8. Bioetanol

1.8.1. Definición

El alcohol etílico o bioetanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. Las plantas crecen gracias al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa de la planta.

El bioetanol es un biocombustible y como tal renovable, a diferencia del petróleo que es un combustible fósil. Los biocombustibles son aquellos carburantes “ecológicos” que substituyen en mayor o menor parte el uso de la gasolina en el transporte. El empleo de estos biocombustibles tiene como objetivo principal el reducir las emisiones de gases de

efecto invernadero que sobrecalientan la superficie terrestre y aceleran el cambio climático. Adicionalmente, se persigue una segunda meta que es la menor dependencia de las importaciones de crudo. Al consumir bioetanol se impulsa la actividad agrícola e industrial y se aumenta el grado de autosuficiencia energética de nuestro país. En España se encuentra la primera empresa productora de bioetanol a nivel europeo existiendo en nuestra geografía varias plantas productoras. Aquí se produce, aquí se consume. Como se muestra en el cuadro 1.7.

Cuadro 1.7. Especificaciones del Bioetanol.

Características	Unidades	Métodos	Límite Mínimo	Límite Máximo
Contenido de etanol	% m/m	EC/2870/2000 – Método I	99.6	
Contenido de metanol	% m/m	EC/2870/2000 – Método III		0.0035
Contenido de alcoholes superiores	% m/m	EC/2870/2000 – Método III		0.035
Contenido de congéneres	% m/m	EC/2870/2000 – Método III		0.08
Contenido de agua	% m/m	EN 15489		0.3
Acidez total	% m/m	EN 15489		0.003
Apariencia	No aplica	Visual	Claro y brillante	
Contenido de cloruro inorgánico	mg/l	EN 154884 o EN 15492		4
Contenido de cobre	mg/kg	EN 15488		0.1
Contenido de fósforo	mg/l	EN 15487		0.15
Contenido de residuos secos	mg/100ml	EC/2870/2000 – Método I		10
Contenido de sulfato	mg/kg	EN 15485 o EN 15486		1

Fuente: Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A

1.8.2. Etanol lignocelulósico

El bioetanol producido a partir de materias lignocelulósicas, también llamado bioetanol de segunda generación, se presenta como alternativa de futuro a los biocombustibles de primera generación. La biomasa lignocelulósica no compite con el mercado alimentario, y, al estar ampliamente distribuida, su coste es menor, lo que contribuye a disminuir el precio final del biocombustible.

1.9. Producción nacional y regional de caña de azúcar

La producción de caña de azúcar en el Perú se concentra en la costa del país, siendo la principal zona productora. Tiene un gran potencial de desarrollo agroindustrial, derivado de la azúcar, etanol y otros productos derivados de su producción. La caña de azúcar considerada uno de los principales cultivos agroindustriales en el Perú, genera un aporte

importante al valor bruto de la producción agropecuaria y en especial en el subsector agrícola.

A diciembre del año 2012 el VBP agropecuaria señala un monto de 22, 226 millones de nuevos soles, el subsector agrícola con 13, 070 millones de nuevos soles y la caña de azúcar aportó aproximadamente 704.3 millones de nuevos soles, con un crecimiento del 4,9 % con respecto al año 2011. Como se muestra en el cuadro 1.8.

Cuadro 1.8. VBP Agropecuario de la Caña de Azúcar

Indicador	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Sector Agropecuario	13,678	13,969	13,914	15,819	17,416	17,889	18,719	21,158	22,226
Subsector Agrícola	8,655	8,795	8,595	9,668	10,558	10,642	11,178	12,426	13,070
Caña de azúcar	520,3	548,6	432.4	441.3	577.5	612.7	606.8	671.5	704.3
Variación (%)		-21.2%	14.8%	14.2%	14.6%	6.1%	-1.0%	10.7%	4.9%

Fuente: MINAG- DGCA.

En el año 2003 se promulgó la Ley No. 28054, según el Ministerio de Agricultura, a través de la Dirección General de Competitividad Agraria (DGCA), reporta que existen unas 81,149 hectáreas cosechadas a diciembre del año 2012, superior en un 13% con respecto al periodo del año anterior. La producción de caña de azúcar viene creciendo a una tasa promedio de 1.8% en los últimos diez años entre el periodo 2002-2011. La mayor producción histórica de azúcar se dio en el año 2012 con 10, 368,866 toneladas producidas. Como se muestra en el cuadro 1.9.

Cuadro 1.9. Producción de caña de Azúcar (Tn)

Departamentos	2009	2010	2011	2012
Lambayeque	2,689.819	2,824.848	2,748.163	2,767.051
La libertad	4,807.415	4,911.755	4,977.202	5,234.476
Ancash	519,197	578,284	663.722	722.001
Lima	1,560.444	1,293.061	1,445.758	1,582.985
Arequipa	67,069	52,947	50,091	62,380
Total	9,936.945	9,660.895	9,884.936	10,368.866

Fuente: MINAG-DGCA.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar y Fecha de Ejecución del Trabajo.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Agrícolas de la Facultad de Agronomía, en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Piura; y en el Laboratorio Control de Calidad de Etanol de la Empresa Agroindustrial Caña Brava - Grupo Romero. La investigación se realizó en el periodo comprendido entre Febrero y Julio del 2014.

2.2. Materia Prima e Insumos

- ✓ Biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.), 60 Kg biomasa lignocelulósica del tallo y 60 Kg biomasa lignocelulósica de hojas, previamente molidos con un periodo vegetativo 180 días procedente de los almacenes de la Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A.
- ✓ Agua purificada (500 litros).
- ✓ NPK 9.6 kg.
- ✓ Metabisulfito de potasio 4.8 kg.

2.3. Materiales, Equipos y Reactivos

2.3.1. Materiales

2.3.1.1. Material de vidrio

- Buretas de 25, 50 y 100 ml
- Fiolas de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 100 y 250 ml
- Tubos de ensayo 10 ml
- Mangueras de plástico
- Papel filtro
- Tapones de goma
- Tela organza
- Lapiceros
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Probeta de 50, 100 y 1000 ml.
- Simulador de reactor
- Embudos
- Libretas de apuntes,
- Cámara fotográfica.
- Plumones
- Marcadores de plásticos
- Prensador de acero inox.

2.3.1.2. Material biológico

- Biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar procedente de los almacenes de la Empresa Agroindustrial Caña Brava.
- Bacteria *Zymomonas mobilis*.

2.3.1.3. Equipos

- Balanza analítica. Marca: Procet Scientific, modelo: BE 1030HA.
- Alcohólimetro Gay – Lussac, rango: 0 – 100 °GL. Marca: France.
- Rotavapor. Marca: LabTech
- Termómetro de mercurio, rango: 0 a 150 °C. Marca: France
- Mufla Marca: THERMO SCIENTIFIC, modelo: FB1315M
- Columna de destilación de rellenos. (Elab. Propia).
- Cocina eléctrica. Marca: Nuova.
- pH metro. Marca: CIENYTE
- Cromatógrafo de gases. Marca: Perkin Elmer
- Densímetro digital. Marca: Anton Paar, Modelo: DMA 4500M
- Espectrofotómetro. Marca: Coleman
- Baño maría. Marca: SWB6D.
- Refractómetro, rango: 0 a 32 °Brix. Modelo: RHB - 32 ATC
- Estufa. Marca: San Jor mod. Modelo: SE33A
- Soxhlet. Marca: G10-0012

2.3.1.4. Reactivos

- Ácido sulfúrico.
- Bisulfito de sodio 0.05 M.
- Hidróxido de sodio 0.1 N.
- Fenolftaleína.
- Ácido clorhídrico 4 M.
- Etanol absoluto (CAS 64-17-5).
- Metanol (CAS 67-56-1)
- Propan-1-ol (CAS 71-23-8).
- Patrones internos sugeridos:
 - Pentan-3-ol (CAS 71-41-0),
 - 4-metil-2-pentanol
 - Etilhexanol
 - 2-metilbutan-1-ol (CAS 137-32-6)
 - 3-metilbutan-1-ol (CAS 123-51-3)
 - Acetato de etilo (CAS 141-78-6)
 - Butan-1-ol (CAS 71-36-3)
 - Butan 2-ol (CAS 78-92-2)
 - Acetaldehído (CAS 75-07-0)
 - Acetal (CAS 105-57-7)
 - 2-metilpropan-1-ol (CAS 78-33-1).
 - 4 metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) o nonanoato de metilo (CAS- 1731-84-6)
 - Metili sobutilcetona.

2.4. Metodología para la Elaboración de Destilado de Caña de Azúcar.

Dentro de los métodos y análisis en el presente trabajo de investigación abarca tres aspectos, de acuerdo a los parámetros establecidos en la extracción y caracterización de alcohol.

2.4.1. Procedimiento experimental para la elaboración alcohol de Biomasa lignocelulósica de Caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*)

La biomasa lignocelulósica del Caña de Azúcar (hojas y tallo), según el tiempo y la temperatura de extracción por vapor se evaluó de la siguiente manera: A= 210 °C x 5.0 min, B = 210 °C x 10.0 min, C= 220 °C x 5.0 min y D= 220 °C x 10.0 min. La unidad experimental fue de 100 ml biomasa lignocelulósica.

- **Recepción y selección de materia prima.-** Se tomó 48 kg biomasa lignocelulósica del tallo y 48 kg biomasa lignocelulósica de hojas molidas, que estén libre de impurezas y cumplan las condiciones necesarias para realizar el pre tratamiento y proceso de fermentación. Las muestras fueron llevadas en bolsas esterilizadas al laboratorio de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

- **Lavado.-** Para el caso del tallo de caña de azúcar, pasó por un lavado en la etapa de la molienda en el cual se obtiene el bagazo, por lo tanto ya no fue necesario lavarlo nuevamente.

Para el caso de las hojas de caña de azúcar, estas fueron recogidas de las áreas cultivadas y se procedió a realizar un lavado con agua destilada para eliminar impurezas. Seguidamente las muestras se secaron al aire libre en mantas y mallas previamente limpias.

- **Molienda.-** Se realizó en un molino triturador pulverizador de 4 roles.
- **Análisis de la materia prima.-** En esta etapa, se realizaron los análisis físico químicos a la materia prima (humedad, grasa, cenizas, fibra, nitrógeno total, fosforo disponible, celulosa, lignina y hemicelulosa) de acuerdo a los métodos especificados que se especifican en el apartado 2.4.3.
- **Pre tratamiento.-** Se tomó en cuenta dos tipos de sustratos (hojas y tallo), factor: dos temperaturas de extracción por vapor (210 y 220 °C) y dos periodos tiempo de extracción por vapor (5.0 y 10.0 min.). Todo el pre tratamiento se realizó en base a 1.5 kg de hojas y 1.5 kg de tallos. Se pesó 1.5 kg de muestra y se colocó en una olla de aluminio, agregándose 4.5 litros de agua destilada y se mezcló.

Se llevó a la estufa y se esperó hasta llegar a la temperatura ideal antes mencionada (210°C y 220°C para cada muestra a analizar), seguido se vertió cuidadosamente 1 litro de agua destilada a la mezcla controlándose los tiempos determinados (5 min. y 10 min. Para cada muestra). Terminado el pre tratamiento, se esperó que la muestra enfríe a temperatura de 30°C.

- **Fermentación.-** Se vertió la muestra al tanque fermentador, agregándose 7 litros de agua destilada a 100 °C, esperando nuevamente que enfríe a 30 °C, en esta etapa se inocularon las bacterias *Zymomonas mobilis* en una cantidad de 1.5 litros de inóculo. Este proceso duró 7 días a una temperatura de 27 a 32 °C.

➤ **Destilación.-** Operación que consistió en separar los componentes de la mezcla líquida. Se realizó en las siguientes etapas: destilación simple, destilación fraccionada (separación de solución alcohólica del mosto), rectificación (purificación hasta 90°GL a 78.4°C).

➤ **Para el proceso de destilación simple:** Se alistó la cocina con rejillas de calentamiento, que proporcionó calor a la mezcla a destilar, luego se alistó la columna de destilación, conectada a un tubo refrigerante que se usó para condensar los vapores que se desprenden de la columna de destilación, por medio de un líquido refrigerante que circula por éste. Se coloca un matraz erlenmeyer al final del tubo refrigerante para recoger el destilado.

Se colocó el termómetro a la misma altura que la salida a la entrada del refrigerador, luego se agregó pequeños trozos de material (vidrio) en la columna, seguidamente se vertió la muestra líquida de biomasa lignocelulósica previamente filtrada, se procedió a calentar la muestra, se registró la temperatura en el momento que cayó la primera gota del destilado en el erlenmeyer. Se anotaron los resultados observados.

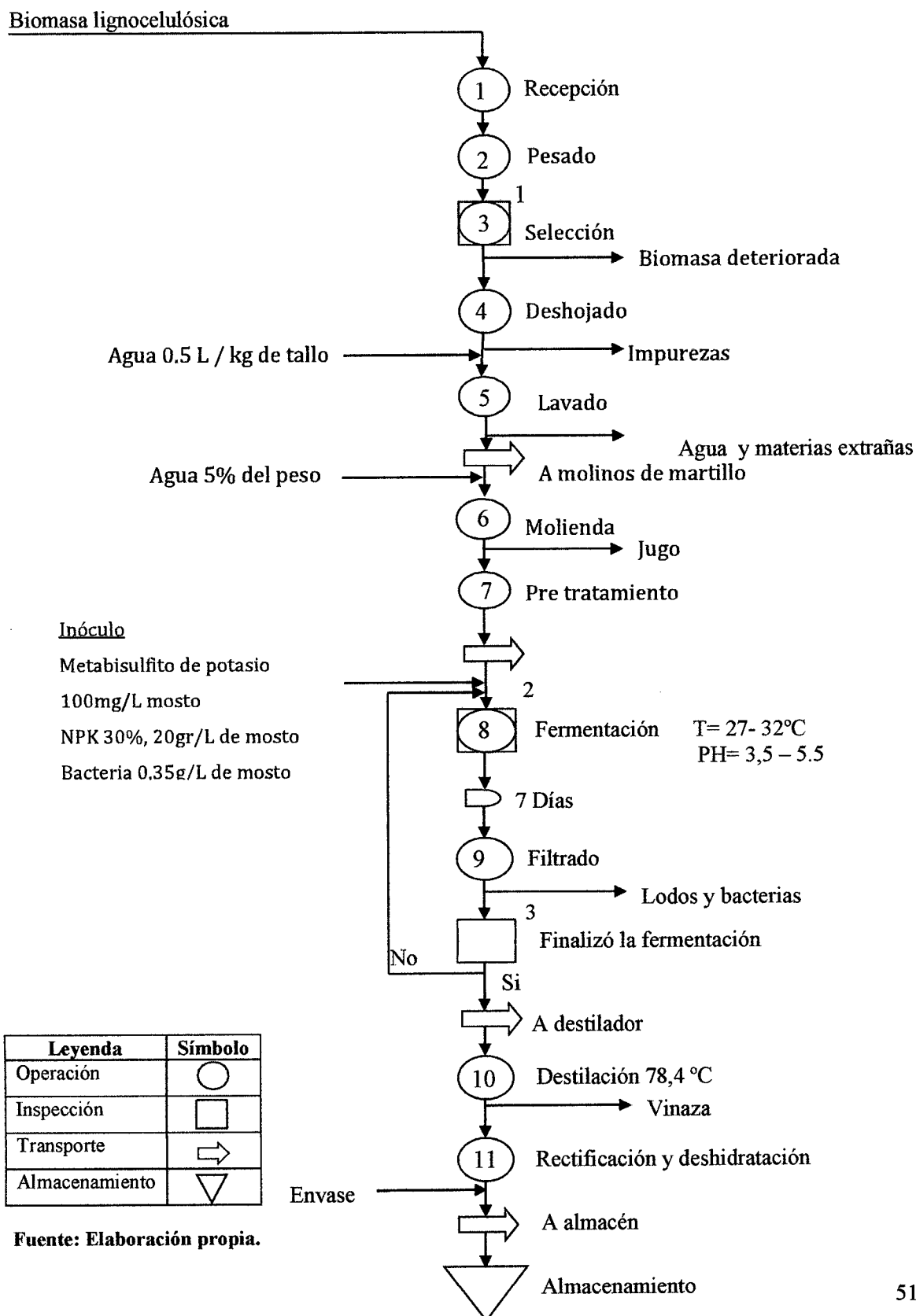
➤ **Para el proceso de destilación fraccionada:** Se realizó el mismo proceso de armado de la columna descrito anteriormente, colocando platos de destilación verticalmente en el interior de la columna en los cuales se le agregó trocitos de vidrio en forma de cuadrado. Se vertió la muestra en la columna, se prendió la cocina, empezó a calentar la muestra, observando el incremento de temperatura en el termómetro, esperándose durante un tiempo, aproximadamente 5 min, hasta que la muestra alcanzó su punto de ebullición, que en este caso fue de 78.4 °C y se procedió a destilar.

➤ **Para el proceso de deshidratado del alcohol:** Se realizó el procedimiento descrito anteriormente, en los platos de destilación se cambió los pedacitos de vidrio por zeolitas. Los siguientes pasos fueron iguales.

Para la caracterización del bioetanol obtenido, las muestras fueron llevadas al laboratorio de control de calidad de la Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A. donde se realizaron los análisis que se especifican en el apartado 2.4.3

El proceso para obtener bioetanol a partir de Caña de Azúcar se esquematiza en el diagrama de operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar mostrado en la figura 2.1, y para determinar el rendimiento físico de jugo Biomasa lignocelulósica de caña de azúcar se esquematiza en la figura 3.1, el mismo que está basado en el balance masa y que se completó al final de la investigación ya que no se encuentran reportes de investigaciones realizadas.

Figura 2.1. Operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar.



2.4.2. Análisis de la Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar.

La muestra de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar fue donada por la Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A. procedentes de sus almacenes de Hojas y Bagazo, en un total de 60 kilos de hojas y 60 kilos de tallos (con periodo vegetativo de 180 días) previamente molidas. Se usaron 48 kg de tallos y 48 kg de hojas, de las cuales se tomó 1.5 kg por cada tratamiento (16 muestras de hojas y 16 muestras de tallos). La cantidad de muestra restante fue usada según el tipo de análisis físico - químico requerido para la biomasa lignocelulósica.

2.4.3. Métodos de Análisis Físico Químicos

Cuadro 2.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

Determinación	Fuente
Humedad	: A.O.A.C. 920.151 (2005)
Grasa	: A.O.A.C 960.39 (2005)
Cenizas	: A.O.A.C. 940.26 (2005)
Fibra	: A.O.A.C. 985.29 (2005)
Nitrógeno total	: A.O.A.C. 981.10 (2005)
Fósforo disponible	: A.O.A.C. 965.17 (2005)
Celulosa	: ANSI/ASTM D1103-60
Lignina	: ANSI/ASTM D1106-56
Hemicelulosa	: ANSI/ASTM D1106-40

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 2.2. Análisis de mosto biomasa lignocelulósica de Caña de Azúcar pre tratada durante la etapa de fermentación.

Determinación	Fuente
Sólidos solubles	: A.O.A.C. 981.12 (2005).
pH	: A.O.A.C. 973.41 (2005).
Acidez	: A.O.A.C. 947.05 (2005).

Fuentes: O.A.AC: Association of Official Analytical Chemists

Cuadro 2.3. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

Determinaciones	Unidad	Fuente
Grado alcohólico	°GL	NTP 211.035. 2008
Densidad	mg/cm ³	Densímetro Digital
pH		A.O.A.C. 973.41 (2005).
Alcoholes superiores	ppm Alcoholes superiores	NTP 211.035. 2008
Aldehídos	ppm Furfural	NTP 211.035. 2008
Acidez acética total	mg Ácido Acético / 100ml AA	NTP 211.035. 2008
Esteres	ppm Acetato de Etilo	NTP 211.035. 2008
Metanol	ppm Metanol	NTP 211.035. 2008

AA= alcohol anhidro (Etanol) C.G.= Cromatografía de Gases

Fuente: (NTP 211.035. 2008).

2.4.4. Análisis del producto final.

a) Determinación de Grado Alcohólico y Densidad.

El densímetro utilizado para determinar la densidad y el grado alcohólico del etanol es marca Anton Paar, modelo DMA 4500M, es un instrumento digital con control-medición integrado para la temperatura que proporciona resultados de la densidad de alta calidad. El densímetro utiliza el método del tubo vibrante, en el cual, se introdujo 10 ml de la sustancia a medir, el tubo empieza a oscilar de tal manera que se va registrando en forma de periodos de vibración, estos periodos son convertidos en resultados de densidad y se registra dentro de la memoria del densímetro.

b) Determinación de acidez total.

Según INDECOPI reportado en la NTP N° 211.035.2008, que consistió en:

- Tomar 100 mL de alcohol como muestra.
- Entibiar ligeramente por un minuto, para elimina el CO₂.
- Agregar fenolftaleína 2 mL como indicador.
- Titular con hidróxido de sodio 0.1 N y anotar el gasto.

$$\text{Acidez total como ácido acético, mg /100 mL AA} = 60 \times N \times V_{AT} \times F_v \times F_G$$

Dónde:

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio, $N=0.1$

V_{AT} = Volumen de NaOH 0.1 N gastado en titulación, mL.

V_M = Volumen de muestra utilizado, mL.

F_V = Factor de corrección de volumen = $100 / V_M$

G_A = Grado alcohólico de la muestra a 15 °C, % Alc. Vol.

F_G = Factor de corrección para alcohol anhidro = $100 / G_A$

c) Determinación de Metanol, Aldehídos, Esteres y Alcoholes Superiores por Cromatografía de Gases.

Se realizó la determinación de congéneres volátiles en el etanol por cromatografía de gases, descritos en el cuadro 2.3 del apartado 2.4.3. Según INDECOPI reportado en la NTP 211.035. 2008: El siguiente procedimiento se realizó en el cromatógrafo de gases del laboratorio de Análisis de Calidad de la Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A. Las Soluciones Patrones que se usaron como prueba de control en el cromatógrafo de gases fueron:

➤ **Solución patrón – A**

Pipetear los componentes que se indican en el cuadro 2.4 más adelante en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 60 ml de solución de etanol al 40% v/v, para reducir al máximo evaporación de los componentes, enrasar con solución de etanol al 40% v/v y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

Cuadro 2.4. Componentes utilizados para Solución patrón – A

Componente	Volumen (ml)
Metanol (CAS 67-56-1)	3.0
Propan-1-ol (CAS 71-23-8).	3.0
2-metilpropan-1-ol (cas 78-33-1).	3.0
2- metilbutan-1-ol (CAS 137-32-6)	3.0
3-metilbutan-1-ol (CAS 123-51-3)	3.0
Acetato de etilo (CAS 141-78-6)	3.0
Butan-1-ol (CAS 71-36-3)	3.0
Butan 2-ol (CAS 78-92-2)	3.0
Acetaldehído (CAS 75-07-0)	3.0
Acetal (CAS 105-57-7)	3.0

Fuente: INDECOPI NTP 211.035. 2008.

➤ Solución patrón – B

Pipetear 3 ml de pentan-3-ol u otro patrón interno adecuado en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml Propan-1-ol (CAS 71-23-8), enrasar con Propan-1-ol (CAS 71-23-8) y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como peso final total.

➤ Solución patrón de control de calidad (CC)

Pipetear 9 ml de solución patrón D y 1 ml de solución patrón E en un matraz y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra.

- ✓ Con la balanza analítica de 0,1 mg de precisión, pesar el matraz y anotar el peso
- ✓ Pipetear 9 ml de solución de etanol al 40 %v/v en el matraz y anotar el peso.
- ✓ Añadir 1 ml de la solución patrón E y anotar el peso. Agitar la disolución vigorosamente (realizando por lo menos 20 inversiones).
- ✓ Las muestras deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 °C antes de análisis para reducir al máximo las pérdidas de sustancias volátiles.

Ensayo preliminar: Inyectar la solución patrón C para comprobar que todos los analitos se separa con una resolución mínima de 0,8 (excepto el 2-metilbutan-1-ol y el 3-metilbutan-1-ol).

Determinación: Inyectar la solución patrón C y dos soluciones patrón de CC, Proseguir con las muestras problema (preparadas con arreglo a los apartados Preparación de la muestra y Ensayo en blanco), insertando un patrón de CC cada 10 muestras para garantizar la estabilidad. Inyectar una solución patrón C cada 5 muestras.

CÁLCULO: Puede utilizarse un sistema automatizado de tratamiento de datos, siempre que éstos puedan comprobarse con arreglo a principios establecidos en la NTP 211.035. 2008.

2.4.5. Diseño experimental y análisis estadístico.

2.4.5.1. Tratamientos

El tipo de materia prima, el microorganismo fermentador y el tipo de biorreactor fueron evaluados con los siguientes tratamientos ver cuadro 2.5.

Cuadro 2.5. Tratamientos

Nº	Tratamientos	Clave
1	Hojas x 210 °C x 5.0 min	S ₁ T ₁ P ₁
2	Hojas x 210 °C x 10.0 min	S ₁ T ₁ P ₂
3	Hojas x 220 °C x 5.0 min	S ₁ T ₂ P ₁
4	Hojas x 220 °C x 10.0 min	S ₁ T ₂ P ₂
5	Tallos x 210 °C x 5.0 min	S ₂ T ₁ P ₁
6	Tallos x 210 °C x 10.0 min	S ₂ T ₁ P ₂
7	Tallos x 220 °C x 5.0 min	S ₂ T ₂ P ₁
8	Tallos x 220 °C x 10.0 min	S ₂ T ₂ P ₂

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

S₁: Sustrato Hojas

T₁: Temperatura de 210 °C

P₁: Periodo de tiempo de 5 min

S₂: Sustrato Tallos

T₂: Temperatura de 220 °C

P₂: Periodo de tiempo de 10 min

2.4.5.2. Diseño Estadístico

El diseño experimental fue de tipo Factorial 2², teniendo como Factor A = Dos tipos de sustrato (hojas y tallo), Factor B = Dos temperaturas de extracción por vapor (210 y 220 °C) y Factor C = Dos periodos tiempo de extracción por vapor (5.0 y 10.0 min.); con cuatro repeticiones; en repeticiones (1, 2, 3 y 4). La unidad experimental 100 ml de etanol obtenido del proceso de destilación.

Modelo estadístico del Factorial:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \xi_{ijkl}$$

$i = 1, 2, \dots, a$ = Número de tipos de sustrato

$j = 1, 2, \dots, b$ = Número de temperaturas

$k = 1, \dots, c$ = Número de periodo de tiempo

$l = 1, \dots, n$ = Número Repeticiones

Dónde:

Y_{ij} = unidad experimental que recibe el tratamiento i y está en el bloque j .

μ = es la medida global o efecto medio.

τ_i = es el efecto del tratamiento i -ésimo.

β_j = es el efecto del tratamiento j -ésimo.

γ_k = es el efecto del tratamiento k -ésimo.

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ij -ésimo.

$(\tau\gamma)_{ik}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ik -ésimo.

$(\beta\gamma)_{jk}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos jk -ésimo.

$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ijk -ésimo.

ξ_{ijk} = es el término del error usual

Este diseño aparece en el cuadro 2.6. La respuesta observada ($y_{11} \dots y_{34}$), son las evaluaciones físico – químicas de (pH, acidez, sólidos totales, etc.)

Cuadro 2.6. Diseño de Factorial.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor							
	210 °C				220 °C			
	Factor C = Periodos tiempo de extracción por vapor				Factor C = Periodos tiempo de extracción por vapor			
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min	
Hojas	Y_{1111}	Y_{1112}	Y_{1121}	Y_{1122}	Y_{2111}	Y_{2112}	Y_{2121}	Y_{2122}
	Y_{1113}	Y_{1114}	Y_{1123}	Y_{1124}	Y_{2113}	Y_{2114}	Y_{2123}	Y_{2124}
Tallo	Y_{1211}	Y_{1212}	Y_{1221}	Y_{1222}	Y_{2211}	Y_{2212}	Y_{2221}	Y_{2222}
	Y_{1213}	Y_{1214}	Y_{1223}	Y_{1224}	Y_{2213}	Y_{2214}	Y_{2223}	Y_{2224}

Fuente: Elaboración propia.

2.4.5.3. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se empleó el análisis de varianzas y la prueba de Duncan al nivel de significancia de 0,05 para los efectos principales. Para todos estos análisis se aplicó la técnica estadística señalada por (Montgomery, 2002). El procedimiento de los datos se efectuó con el modelo ANVA. El método utilizado se detalla en el cuadro 2.7.

Cuadro 2.7. Análisis de varianza para el experimento

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F_o
Factor A		a -1=1		
Factor B		b -1=1		
Factor C		c -1=1		
Interacción AB		(a -1) (b -1)=1		
Interacción AC		(a -1) (c -1)=1		
Interacción BC		(b -1) (c -1)=1		
Interacción ABC		(a -1) (b -1) (c -1)=1		
Error		abc (n-1)=24		
Total		abcn -1= 31		

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Análisis de físico químico de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar

Para el Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum L.*) la selección de muestras de la materia prima se realizó de la siguiente manera: La muestra de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar fue donada por la Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A. procedentes de sus almacenes de Hojas y Bagazo, en un total de 60 kilos de hojas y 60 kilos de tallos (con periodo vegetativo de 180 días) previamente molidas. Se usaron 1.5 kg de tallos y 1.5 kg de hojas por cada tratamiento (16 muestras de hojas y 16 muestras de tallos), la materia prima restante se usó para los demás tratamientos.

En el cuadro 3.1., se muestran los resultados del análisis físico-químico de la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar obtenidos de los tratamientos en estudio que se realizaron en el Laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

En el contenido de humedad de los tallos de caña de azúcar se muestra un porcentaje de 73.54% y en las hojas 72.38%. El tallo tiene relación directa con el alto nivel de porosidad de sus partículas; de ahí, resulta su capacidad de absorción entre 70 y 80% de agua. (Villar, *et al.*, 1996).

En el análisis de cenizas de tallos, al obtener un porcentaje de 3.17%, supera en un 0.17% al valor referencial establecido en por Pereira Hernández, *et al.*, (2010), tal y como se muestra en el cuadro 1.3 del apartado 1.2.3. Para el análisis de hojas, se muestra un porcentaje de cenizas de 2%, el cual se encuentra entre los datos citados por bibliografía. Estos valores están influenciados por la operación de molienda y filtrado del jugo.

En el análisis de grasa total se muestra un porcentaje de 0.65% para tallos y 0.94% para hojas. Estos valores obtenidos se encuentran de forma referencial entre los datos de grasa total asignado por Morrison, (1990), para la caña de azúcar agrega que la variación se debe a las características propias y metabolismo del cultivo.

El porcentaje de fibra que se obtuvo fue de 22.54% para tallos y 18.07% para hojas, pues el bagazo de caña y todo el material lignocelulósico es un manojo de hebras fibrosas de la corteza; por tratarse de un material lignocelulósico la composición obtenida para tallo fue: principalmente de celulosa 41.3%, hemicelulosa 25.5%, lignina 29.7%, y para hojas un porcentaje de celulosa 36.8%, hemicelulosa 21% y lignina 28%. El porcentaje de material lignocelulósico obtenido en dichos resultados permite seleccionar a la materia prima como el resultado más conveniente para el proceso (López, *et al.*, 2001).

El contenido de nitrógeno total (tallo 0.45%) y (hojas 0.17%) es constituyente importante para la planta, dependen del contenido disponible en el suelo, así como de los diversos factores de clima y manejo que afectan y/o determinan su aprovechamiento.

En el análisis de fósforo se muestra para (tallo 0.12%) y (hojas 0.21%). El fósforo absorbido es transformado parcialmente en las raíces de planta, tiene una importante función en el desarrollo de la fermentación. (Quintero, 1997).

La determinación de pH que se obtuvo para (tallos pH: 5.67) y (hojas pH: 4.76). Valores que se encuentran dentro del rango dado por (Rodhes, 1969).

La composición de las hojas y tallos empleados en los análisis experimentales, se detallan en el cuadro 3.1. Como se observa, el contenido en celulosa (41.30 y 36.80 %) y hemicelulosa (25.50 y 21.00%) varía según las características de la planta. La composición en carbohidratos estructurales y lignina puede variar debido al fertilizante empleado durante su cultivo, contenido en minerales del suelo o a la madurez que haya alcanzado la planta en el momento de su recolección (Öhgren *et al.*, 2006).

Cuadro 3.1. Resultados de Análisis físico – químico de biomasa lignocelulósica promedio del cultivo de Caña de Azúcar

ANÁLISIS	TALLO	HOJA
Humedad	73.54	72.38
Grasa total	0.65	0.94
Cenizas	3.17	2.00
Fibra	22.54	18.07
Fosforo	0.12	0.21
Nitrógeno total	0.45	0.17
Celulosa	41.30	36.80
Hemicelulosa	25.50	21.00
Lignina	29.70	28.00
pH	5.67	4.76

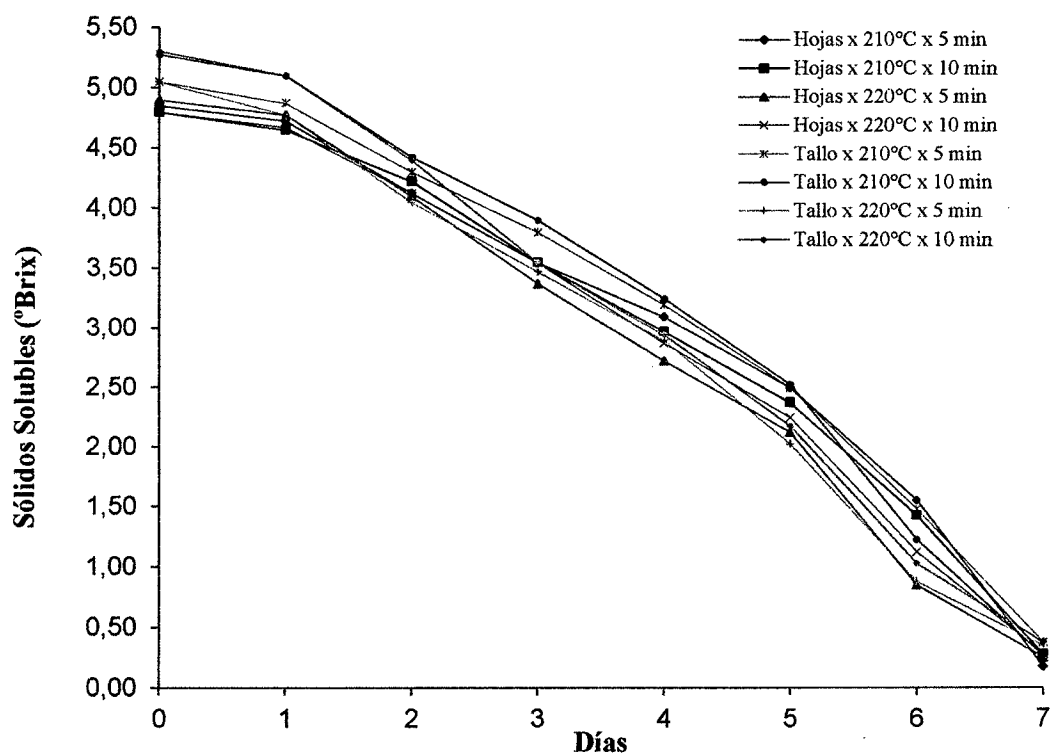
Fuente: Elaboración propia.

3.2. Análisis de fermentación

3.2.1. Variación de sólidos solubles totales.

Durante el proceso de fermentación se observó que en condiciones de temperatura ambiente, la concentración de azúcares disminuye y muestra que la bacteria *Zymomonas mobilis* sufre restricciones o los valores se mantienen constantes cuando la concentración llega a 0.18, 0.28, 0.25 y 0.29 °Brix para los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y 0.38, 0.26, 0.35 y 0.38 °Brix para los tratamientos S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂. Tal y como se puede observar en el **gráfico 3.1**, el consumo de los azúcares presentes en el medio fueron consumidos en su totalidad. Los datos de la variación de sólidos solubles se detallan en el **anexo 2.1**.

Cabe mencionar, que los productos tóxicos presentes en el medio de fermentación (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico) afectan al metabolismo de las bacterias de manera significativa reduciendo la tasa de consumo de los azúcares (Taherzadeh *et al.*, 2000b).



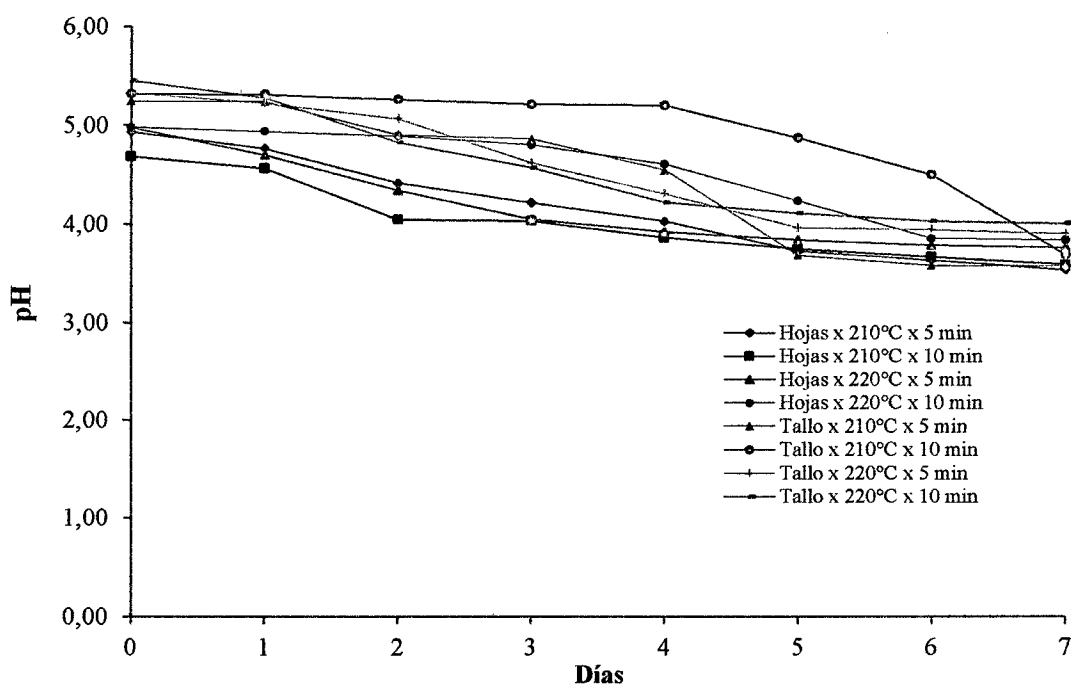
Gráfica 3.1. Variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

3.2.2. Variación de pH

El proceso de fermentación de Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum L.*), se realizó en condiciones ambientales, el valor promedio de pH durante este proceso disminuye ligeramente por el aumento de la concentración de los iones hidronio producidos por la bacteria *Zymomonas mobilis* al transformar los azúcares.

Durante la fermentación se muestra que cuando las bacterias según la ruta de *Entner-Doudoroff* genera ácidos, se liberan iones hidronio teniendo un efecto notable sobre la toxicidad, cuando dejan de transformar los azúcares (séptimo día), el valor promedio de pH se mantiene aproximadamente constante a valores de 3.54, 3.60, 3.77 y 3.85 para los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y de 3.58, 3.70, 3.91 y 4.02 de pH para los tratamientos S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂. Tal y como se muestra en el **anexo 2.2** y **gráfico 3.2**.



Gráfica 3.2. Variación del pH en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.

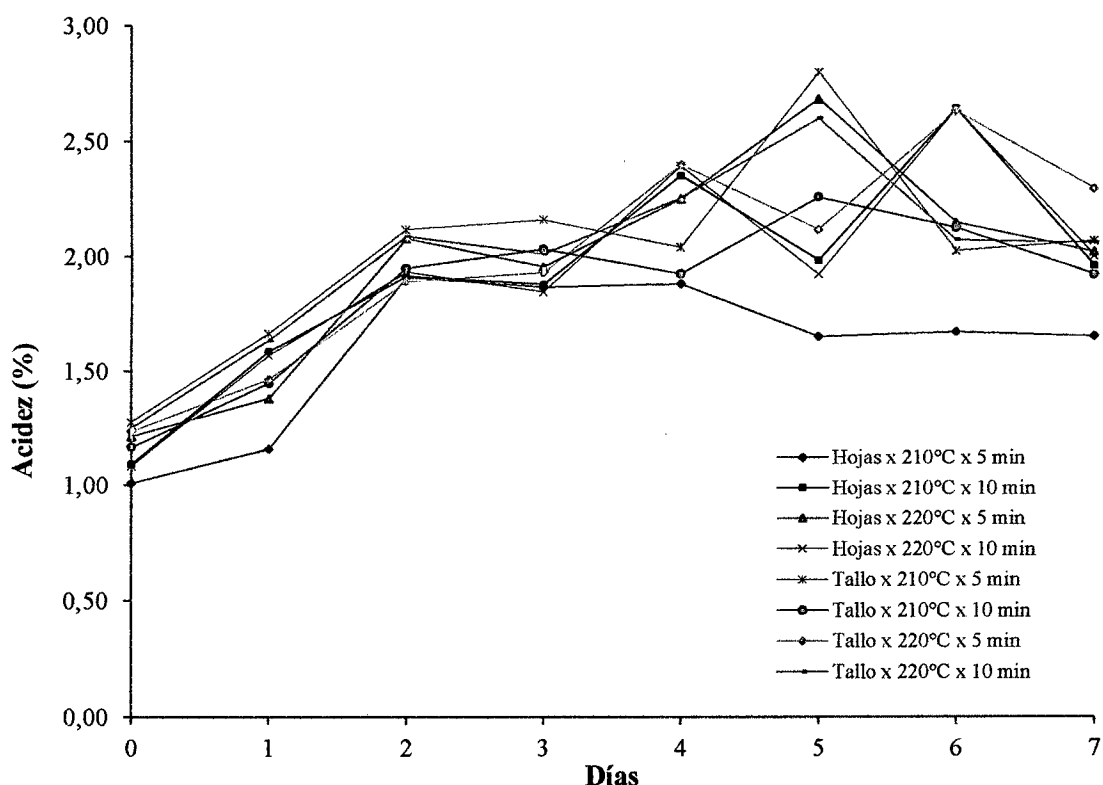
Fuente: Elaboración propia.

3.2.3. Variación de acidez (% Ac. Sulfúrico)

En el proceso de fermentación en condiciones ambientales de Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum L.*), se observó que el valor de la acidez respecto a la concentración de ácido sulfúrico aumenta ligeramente debido al aumento de la producción de ácidos producidos por la bacteria al transformar los azúcares.

En el experimento se evidenció que durante el séptimo día de iniciada la fermentación se mostró que las bacterias dejan de transformar los azúcares, el valor promedio de la acidez se vuelve constante en 1.627, 2.185, 2.005 y 1.944 % Ac. Sulfúrico para los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y de 1.929, 2.254, 2.025 y 1.925 % Ac. Sulfúrico para los tratamientos S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂. Tal y como se muestra en el **anexo 2.3 y Gráfico 3.3.**

Resultados respaldados por Tomas *et al.*, (2009), quien menciona que la concentración de ácidos aumenta cuanto mayor es la temperatura de pre tratamiento.



Gráfica 3.3. Variación del contenido de Acidez (% Ac. Sulfúrico) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Rendimiento Físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹)

En el análisis de varianza del rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹), ver **cuadro 3.2.**, se aprecia que existe alta significancia estadística para los tratamientos en estudio y sus interacciones. El coeficiente de variabilidad obtenido fue 5.97 %.

Según el **Anexo 2.4.**, se reportan los datos experimentales obtenidos del análisis de rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹), de los tratamientos en estudio.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 3.3 y gráfico 3.4**, de la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad, se visualiza que el sustrato tallo obtuvo 961.11 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, y superó estadísticamente al sustrato hoja que obtuvo 721.17 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad en el **cuadro 3.3 y gráfico 3.5**, visualiza que con la temperatura de extracción de vapor a 210°C se obtuvo 1111.40 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, la cual superó estadísticamente a la temperatura de 220 °C que obtuvo 570.88 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad, ver **cuadro 3.3 y gráfico 3.6**, se observa que el tiempo extracción por vapor a 5.00 min obtuvo 1023.72 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 10.00 min que obtuvo 658.56 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad, ver **cuadro 3.3**, se expresa que al estudiar el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, el tratamiento S₁T₁P₁ al lograr 1091.00 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, superó estadísticamente a los tratamientos S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂ que obtuvieron 788.58, 638.10 y 367.00 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 1570.43 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, superó estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron 995.59, 795.35 y 483.06 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Analizada la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.3**, para la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato se determinó que, en la comparación vertical el tratamiento $S_2T_1P_1$ obtuvo 1570.43 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ superando estadísticamente al tratamiento $S_1T_1P_1$ que obtuvo 1091.00 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹; sin embargo la parejas de tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_1T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_1T_2P_1$, y $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 995.59 y 788.58, 795.35 y 638.10, y 483.06 y 367.00 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

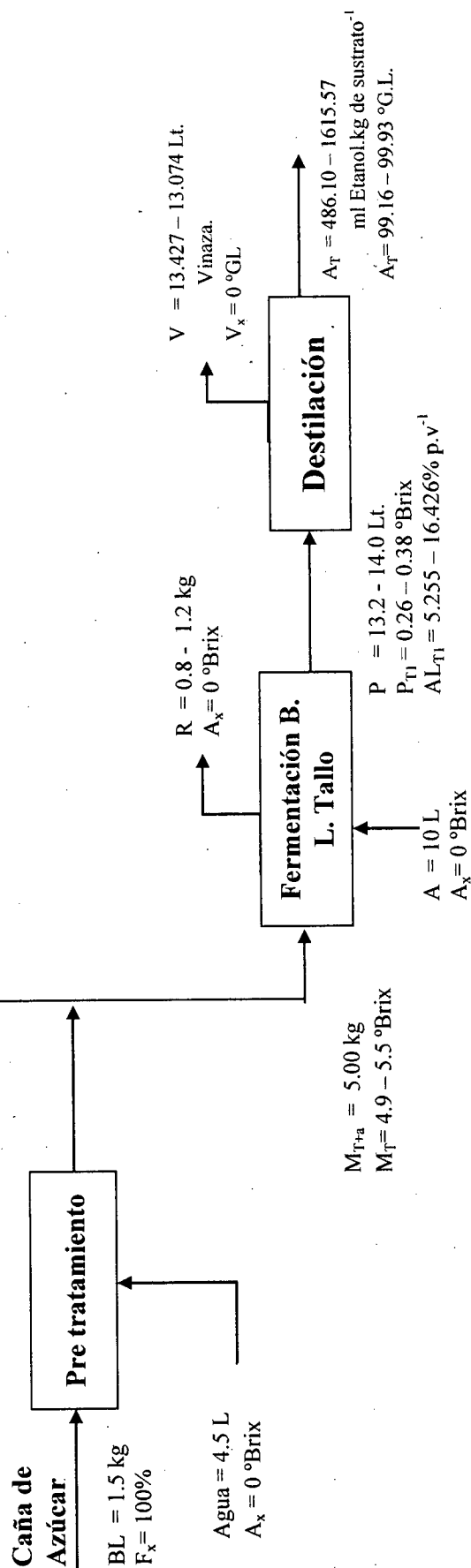
Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.3**, observamos que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 1570.43 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ superó a todos los tratamiento estudiados.

Según Ward, (1989), el nivel de producción de alcohol se debe a las restricciones del tipo de Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, a la carencia de los azúcares en el momento de la degradación y al tipo de destilación a la que es sometido un compuesto hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía (Geankoplis, 1998).

El mejor rendimiento Físico lo obtuvo el tratamiento $S_2T_1P_1$ y se visualiza en el **gráfico 3.7.**, ya que, para producir altas concentraciones de etanol son necesarias altas cargas de sustrato iniciales que impliquen mayor concentración de azúcares fermentables. Teniendo en cuenta el contenido de glucosa en la biomasa lignocelulósica, serán necesarias cargas de sustrato de entre 10-15%, considerada ésta concentración como punto de referencia para una destilación económicamente viable (Ballesteros *et al.*, 2006).

Figura 3.1. Rendimiento físico del proceso de producción de etanol a de Biomasa Lignocelulósica de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum* L.).



Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.2. Análisis de varianza para el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹).

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Sig.
Tipo de sustrato	460568.6626	1	460568.6626	182.6190	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	2337333.5205	1	2337333.5205	926.7708	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	1066724.0395	1	1066724.0395	422.9643	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	85335.0890	1	85335.0890	33.8360	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	49173.9079	1	49173.9079	19.4978	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	43178.8970	1	43178.8970	17.1208	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	26736.0567	1	26736.0567	10.6011	**
Error	60528.4557	24	2522.0190		
Total	4129578.6290	31			

CV = 5.97%

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.3. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A =		210 °C				220 °C				
Tipo sustrato	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Efecto Tipo	
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		Sustrato	
Hojas	1091.00	A b	788.58	ABa	638.10	Ba	367.00	Ca	721.17	b
Tallo	1570.43	Aa	995.59	Ba	795.35	Ba	483.06	Ca	961.11	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor				210 °C =	1111.40	A	220 °C =	570.88	B	
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor				5.0 min =	1023.72	A	10.0 min =	658.56	B	

Comparaciones horizontales: Letras mayúsculas

Comparaciones verticales: Letras minúsculas

Fuente: Elaboración Propia.

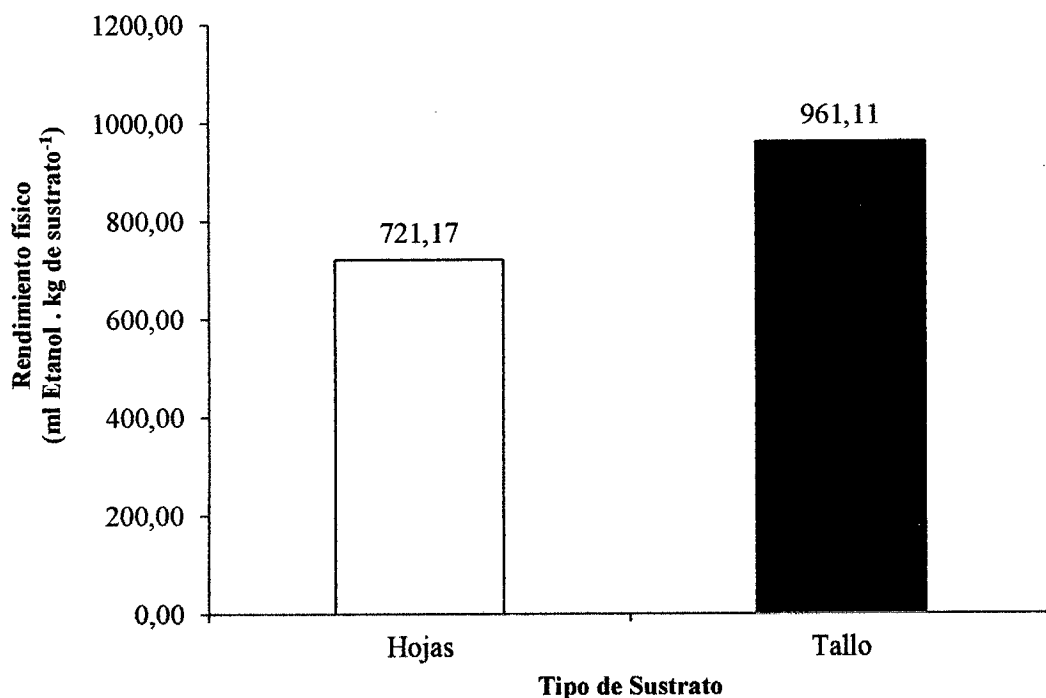


Gráfico 3.4. Efecto principal tipo de sustrato sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

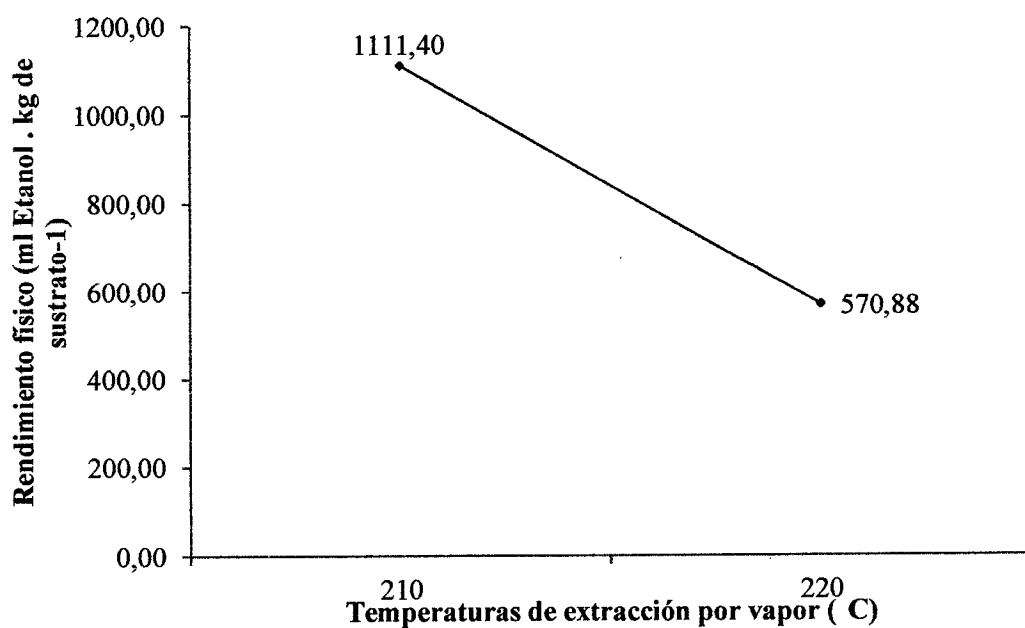
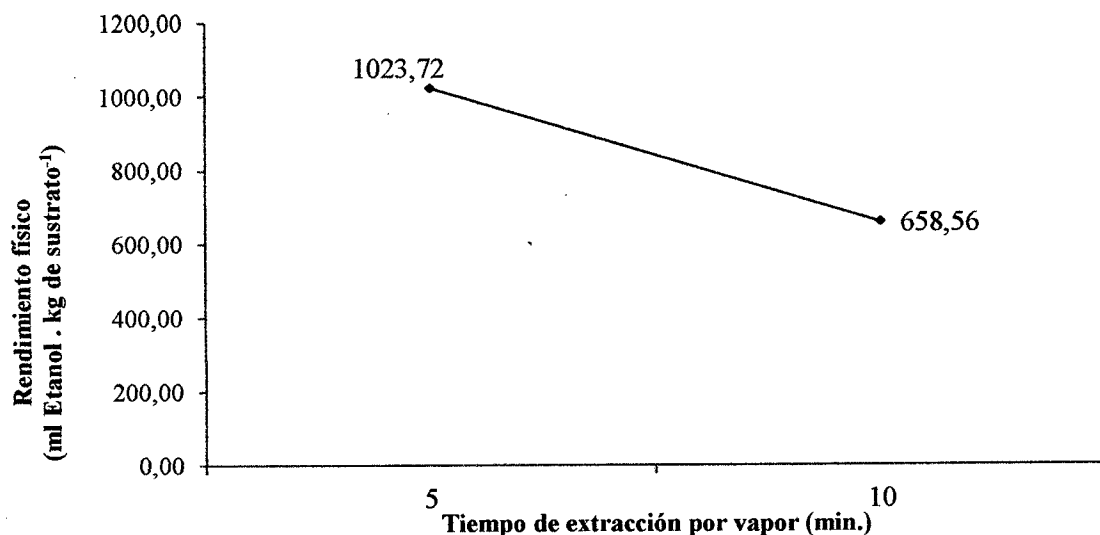


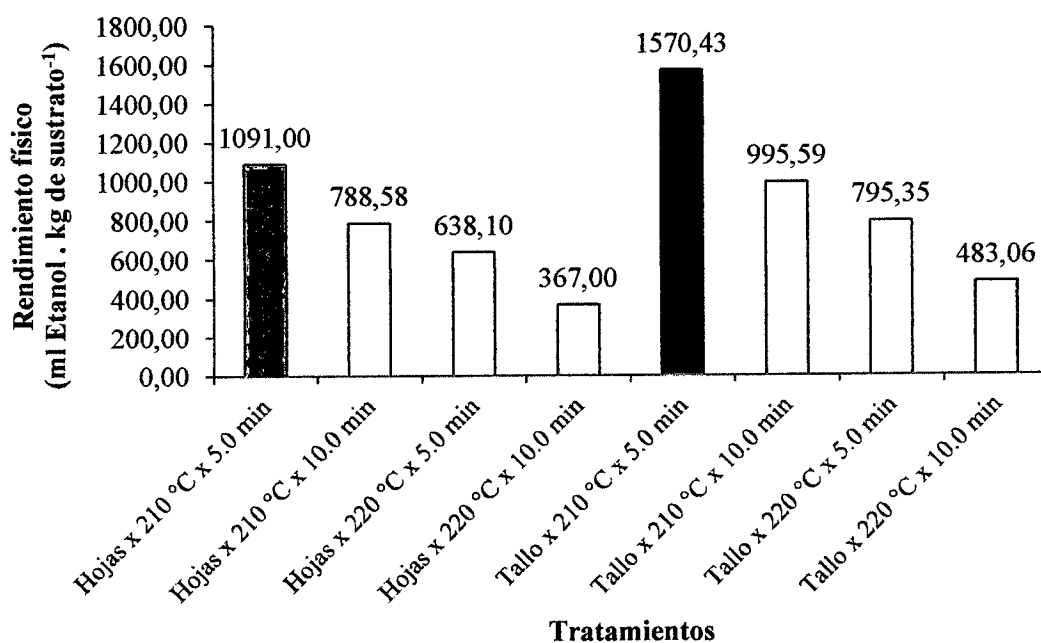
Gráfico 3.5. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.



Fuente: Elaboración Propia.

Gráfico 3.6. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.



Fuente: Elaboración Propia.

Gráfico 3.7. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.

3.4. Producción de etanol (%p.v⁻¹)

Las variables más importantes en el pre tratamiento por extracción con vapor, son la temperatura, el tiempo de residencia, el contenido en humedad del material y el tamaño de partícula, al aumentar la severidad del pre tratamiento (mayor temperatura y tiempo) aumenta la solubilización de las hemicelulosas haciéndose la celulosa más accesible al ataque enzimático. Sin embargo, condiciones de pre tratamiento demasiado severas produce una degradación de los azúcares hemicelulósicos y de la celulosa, originándose una serie de productos tóxicos que van a afectar a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación (Ballesteros *et al.*, 2006). El **anexo 2.5**, reporta los datos experimentales obtenidos para producción de etanol (%p.v⁻¹), a partir de los tratamientos en estudio. En el **cuadro 3.4.**, en el análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v⁻¹), se observa una alta significancia estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción con vapor, periodo de tiempo de extracción con vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 5.87 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

El **cuadro 3.5**, de la Prueba de Duncan 0.05% de probabilidad y el **gráfico 3.8** visualiza que el sustrato tallo al haber obtenido 10.18 y hoja 7.70 %p.v⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.5** y **gráfico 3.9** se observa que a temperatura de 210°C se obtuvo 11.74 %p.v⁻¹, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 6.15 %p.v⁻¹.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se detalla en el **cuadro 3.5**, expresa que con el tiempo extracción con vapor a 5.00 min se obtuvo 10.85 %p.v⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción con vapor de 10.00 min que obtuvo 7.04 %p.v⁻¹ tal y como se muestra en el **gráfico 3.10**.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor.

El análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, tal y como se observa en el **cuadro 4.5**, detalla que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 11.63 %p.v⁻¹, superó estadísticamente a los tratamientos $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ que obtuvieron 8.36 y 6.84 %p.v⁻¹ los cuales fueron iguales, y superaron al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 3.99 %p.v⁻¹ respectivamente. Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 16.43 %p.v⁻¹, superó estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 10.54 y 8.51 %p.v⁻¹ los cuales fueron iguales, superando al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 5.25 %p.v⁻¹ respectivamente.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.5**, se determinó que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor sobre el Tipo de sustrato, que en la comparación vertical, el tratamiento $S_2T_1P_1$ al obtener 16.43 %p.v⁻¹ superó estadísticamente al tratamiento $S_1T_1P_1$ que obtuvo 11.63 %p.v⁻¹; sin embargo las parejas de tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_1T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_1T_2P_1$, y $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 10.54 y 8.36, 8.51 y 6.84, 5.25 y 3.99 %p.v⁻¹, respectivamente, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se muestra en el **cuadro 3.5**, se observa que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio el tratamiento $S_2T_1P_1$ logró 16.43 %p.v⁻¹ superando a todos los tratamientos estudiados. Para Ward, (1989), el nivel de producción de alcohol se debe al tipo de Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, a la carencia de los azúcares por degradar y al tipo de destilación a la que es sometida hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía. Por lo tanto el mejor rendimiento Físico lo obtuvo el tratamiento $S_2T_1P_1$, tal como se muestra en el **gráfico 3.11**.

Cuadro 3.4. Análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v⁻¹).

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Sig.
Tipo de sustrato	49.1194	1	49.1194	178.4264	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	249.5903	1	249.5903	906.6377	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	116.5826	1	116.5826	423.4868	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	8.1747	1	8.1747	29.6948	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	4.5918	1	4.5918	16.6798	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	4.6368	1	4.6368	16.8431	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	2.4521	1	2.4521	8.9073	**
Error	6.6070	24	0.2753		
Total	441.755	31			
			CV =	5.87%	

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.5. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v-1).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	11.63	Ab	8.36	Ba	6.84	Ba	3.99	Ca	7.70	a
Tallo	16.43	Aa	10.54	Ba	8.51	Ba	5.25	Ca	10.18	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor										
			210 °C =		11.74		220 °C =		6.15 B	
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor										
			5.0 min =		10.85		10.0 min =		7.04 B	
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas										
Comparaciones verticales : Letras minúsculas										
Fuente: Elaboración Propia.										

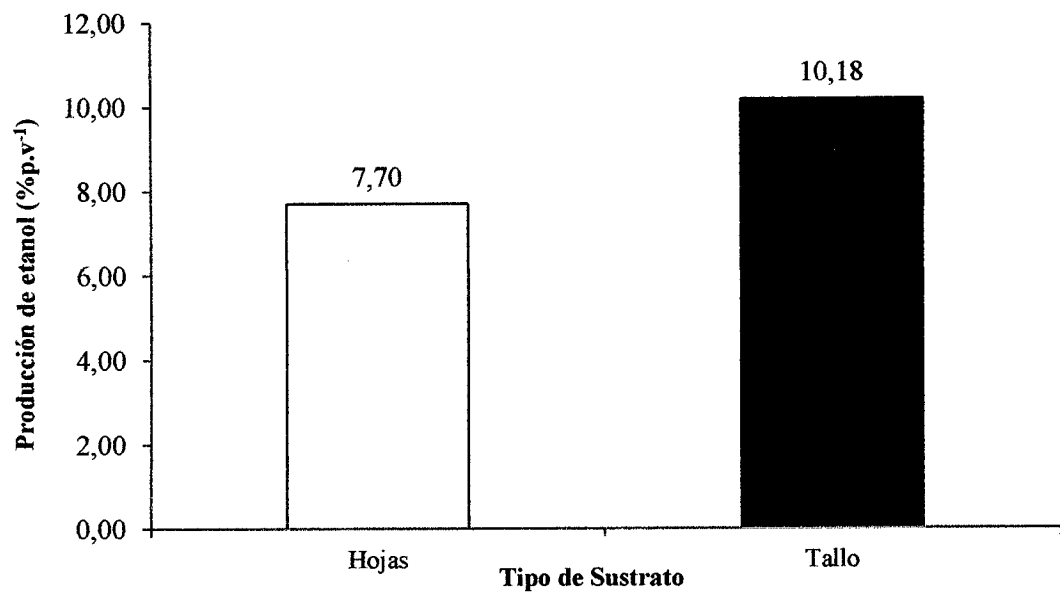


Gráfico 3.8. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la producción de etanol (%p.v-1) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

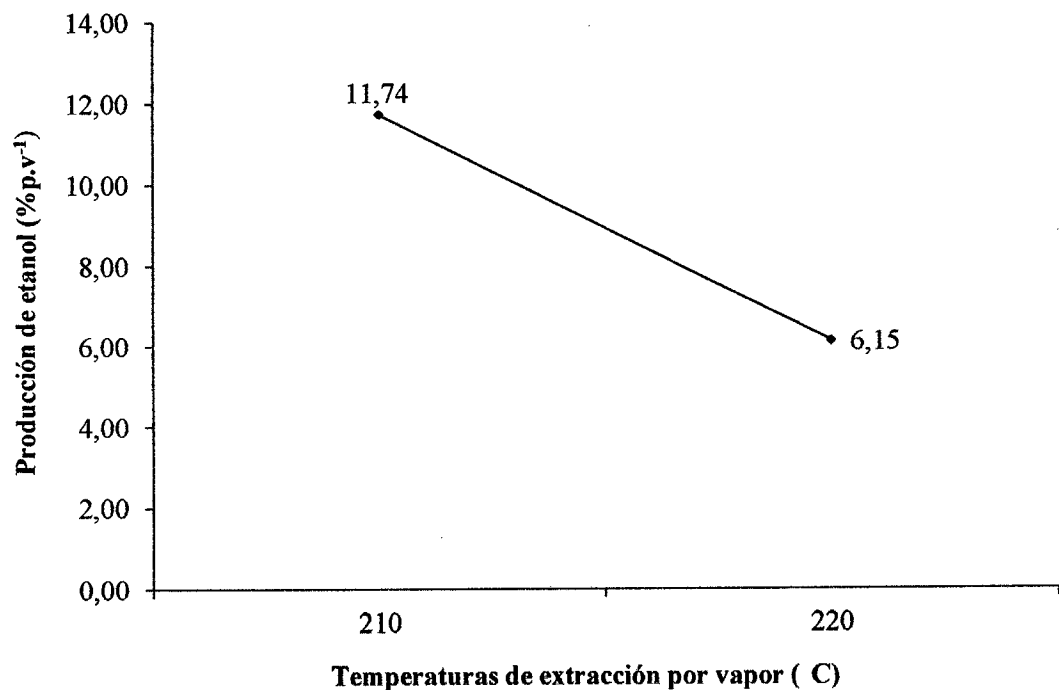


Gráfico 3.9. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

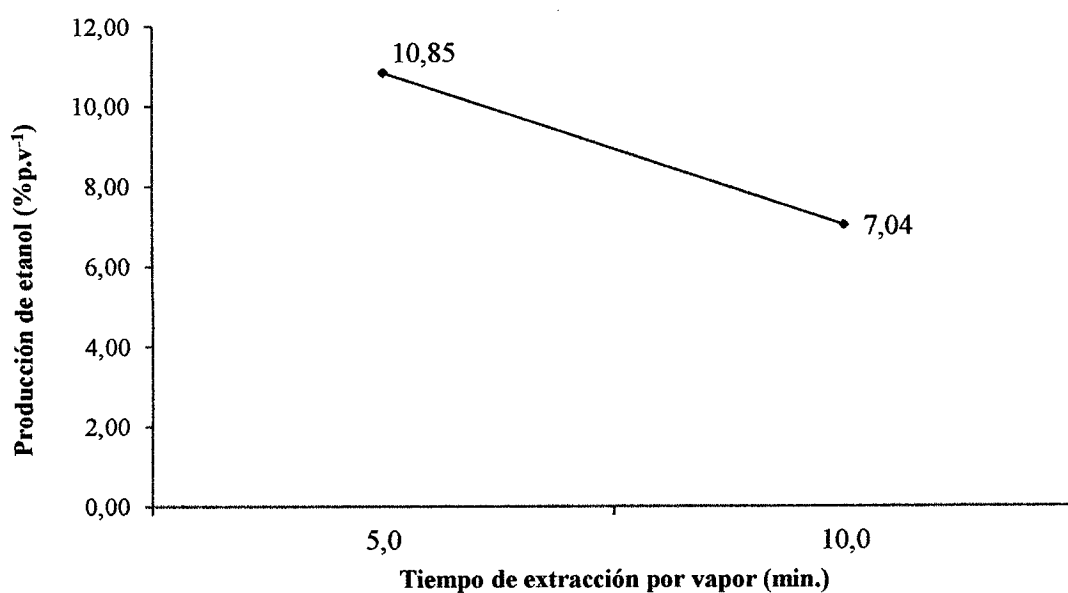


Gráfico 3.10.Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

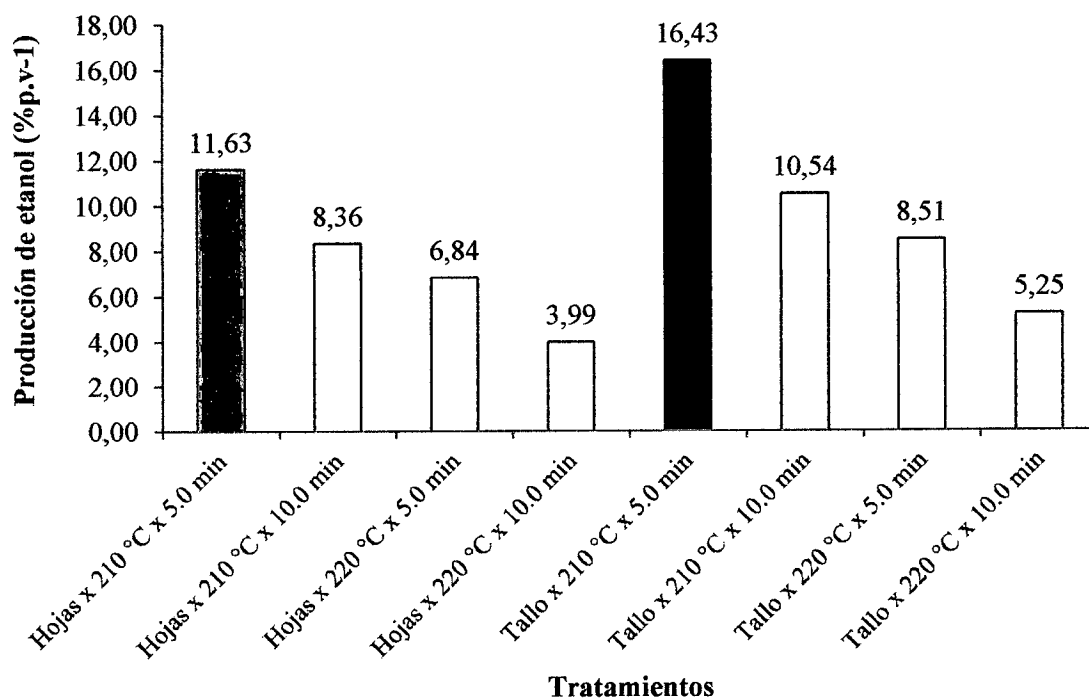


Gráfico 3.11.Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.5. Tasa de producción alcohólica (gh.l⁻¹)

En el **cuadro 3.6** y el **Anexo 2.6** se reportan los resultados de la tasa de producción alcohólica (gh.l⁻¹), teniendo en cuenta los tratamientos en estudio Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C) y Tiempo de extracción por vapor (min).

En el proceso de fermentación se observó que la mayor producción alcohólica (gh.l⁻¹) se obtiene con el tratamiento S₂T₁P₁ que obtuvo una tasa de 0.28 en el tercer día de fermentación y superó a los tratamientos S₂T₁P₂, S₁T₁P₁, S₂T₂P₁, S₁T₂P₁, S₁T₁P₂ que obtuvieron una tasa de 0.21, 0.19, 0.16, 0.13 y 0.12 en el tercer día de fermentación, los cuales superaron a los tratamientos S₂T₂P₂ y S₁T₂P₂ que obtuvieron una tasa de 0.10 y 0.09 en el segundo día de fermentación.

En el **gráfico 3.12** se observa que los azúcares presentes en el medio fueron consumidos en su totalidad durante las primeras 48-72 h de proceso. Sin embargo, todavía quedaban azúcares residuales tras 148 h de fermentación. Cabe mencionar, que los productos tóxicos presentes en el medio de fermentación (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico) afectan al metabolismo de las bacterias de manera significativa reduciendo la tasa de consumo de los azúcares (Taherzadeh 2000b).

Cuadro 3.6. Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l⁻¹).

	Hojas x	Hojas x	Hojas x	Hojas x	Tallo x	Tallo x	Tallo x	Tallo x
Día	210°C x 5	210°C x	220°C x	220°C x	210°C x	210°C x	220°C x	220°C x
	min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min
0-1	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00
1a2	0.09	0.10	0.06	0.09	0.13	0.08	0.07	0.10
2a3	0.19	0.12	0.13	0.04	0.28	0.21	0.16	0.07
3a4	0.11	0.06	0.06	0.02	0.16	0.09	0.07	0.04
4a5	0.05	0.03	0.03	0.01	0.06	0.03	0.03	0.01
5a6	0.03	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
6a7	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00

Fuente: Elaboración Propia.

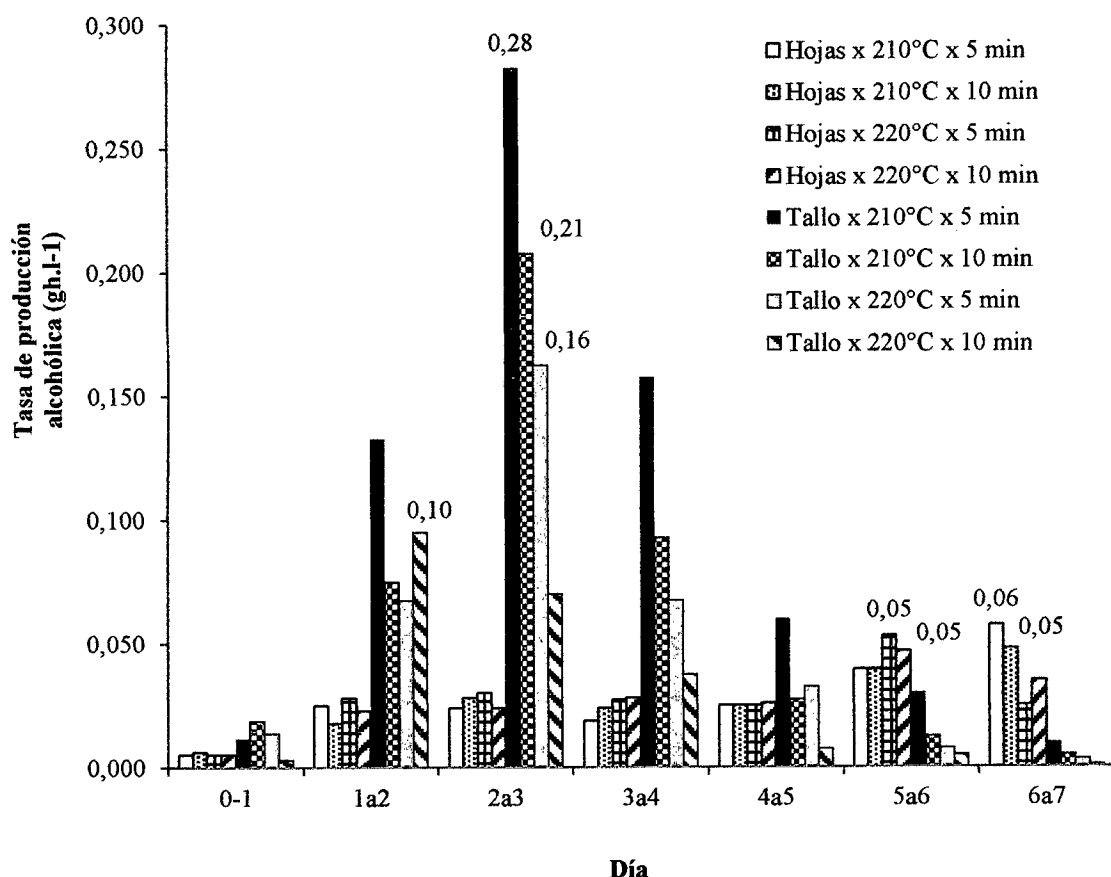


Gráfico 3.12. Tasa promedio de producción alcohólica (g.l⁻¹h).

Fuente: Elaboración Propia.

3.6. Análisis cromatográfico del etanol

3.6.1. Grado alcohólico (°GL.)

En el **Anexo 3.1**, se reportan los datos experimentales obtenidos para el grado alcohólico (°GL.), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

El análisis de varianza para el grado alcohólico (°GL.), como se observa en el **cuadro 3.7**, reporta que no existe significación estadística para el tipo sustrato, temperatura de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor y sus interacciones; con excepción de la interacción entre (tipo sustrato por temperatura de extracción por vapor) que tiene alta significancia. El coeficiente de variabilidad fue 0.22 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 4.8**, visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 99.65 y 99.55 °G.L., fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Analizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad en el **cuadro 4.8**, se indica que a temperatura de 220°C se obtuvo 99.65 °G.L., y superó estadísticamente a la temperatura 210 °C que obtuvo 99.55 °G.L. y se visualiza **gráfico 3.13**.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 4.8**, se observa que con el tiempo extracción por vapor de 10.00 min se obtuvo 99.63 °G.L., y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 5.00 min que obtuvo 99.58 °G.L. ver **gráfico 3.14**

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 3.8**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad reporta que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 99.80, 99.66, 99.55 y 99.60 °G.L., respectivamente, fueron estadísticamente iguales.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 99.37, 99.39, 99.62 y 99.85°G.L., respectivamente, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.8**, expresa que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, indica que, en la comparación vertical los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 99.80, 99.66, 99.55 y 99.60 °G.L. superaron

estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 99.37, 99.39, 99.62 y 99.85 °G.L.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 3.8** y **gráfico 3.15**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad se visualiza que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, que en promedio el tratamiento $S_2T_2P_2$ al lograr 99.85 °G.L. superó a todos los tratamiento estudiados.

Para Geankoplis, (1998), el grado alcohólico del etanol obtenido dependerá del tipo de destilación a la que es sometida hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía.

Cuadro 3.7. Análisis de varianza para el grado alcohólico (°GL.)

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.0770	1	0.0770	1.6432	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	0.0810	1	0.0810	1.7280	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.0149	1	0.0149	0.3174	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.5228	1	0.5228	11.1518	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0587	1	0.0587	1.2512	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0790	1	0.0790	1.6854	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0004	1	0.0004	0.0081	NO
Error	1.1250	24	0.0469		
Total	1.9587	31			
CV =			0.22%		

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.8. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el grado alcohólico (°GL.).

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	99.80	Aa	99.66	Aa	99.55	A b	99.60	A b	99.65	a
Tallo	99.37	A b	99.39	A b	99.62	Aa	99.85	Aa	99.55	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor				210 °C =	99.55	B	220 °C =	99.65	A	
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor				5.0 min =	99.58	B	10.0 min =	99.63	A	

Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas

Comparaciones verticales : Letras minúsculas

Fuente: Elaboración Propia.

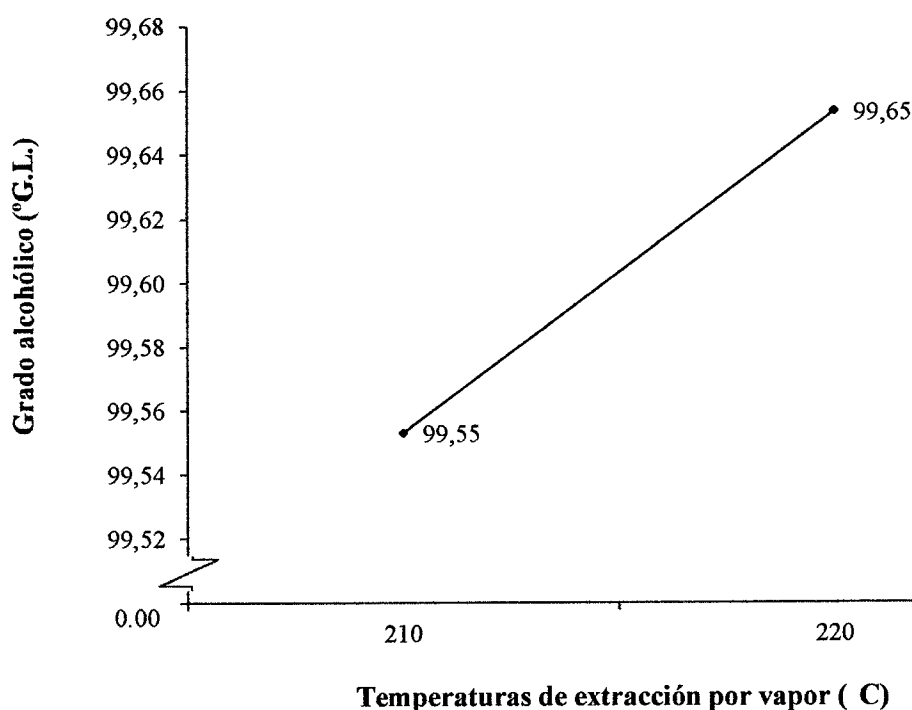


Gráfico 3.13. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el grado alcohólico (°GL.), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

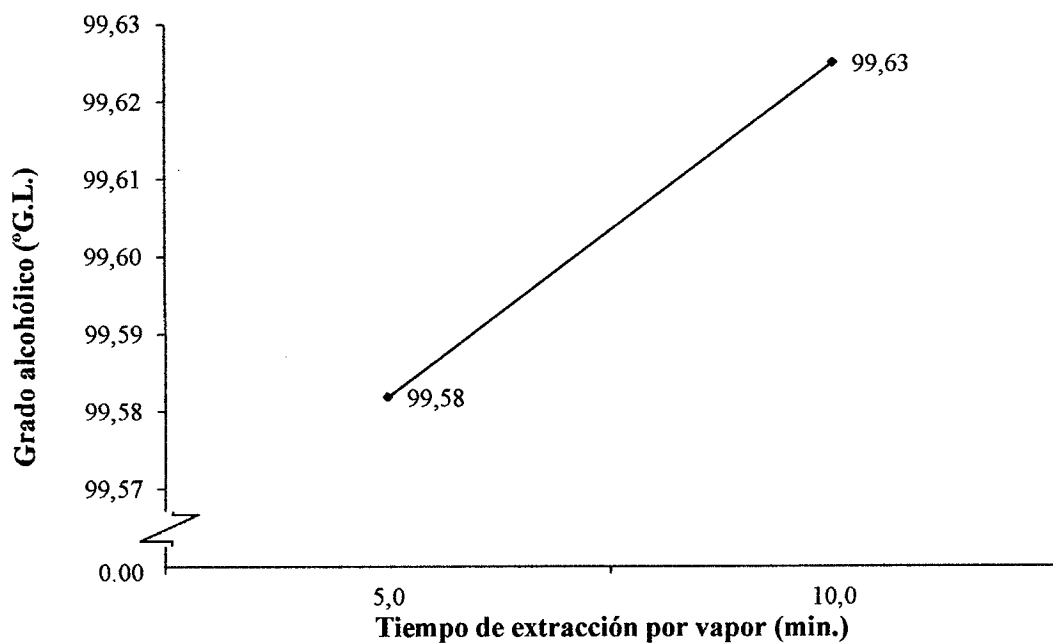


Gráfico 3.14. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el grado alcohólico (°GL.), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

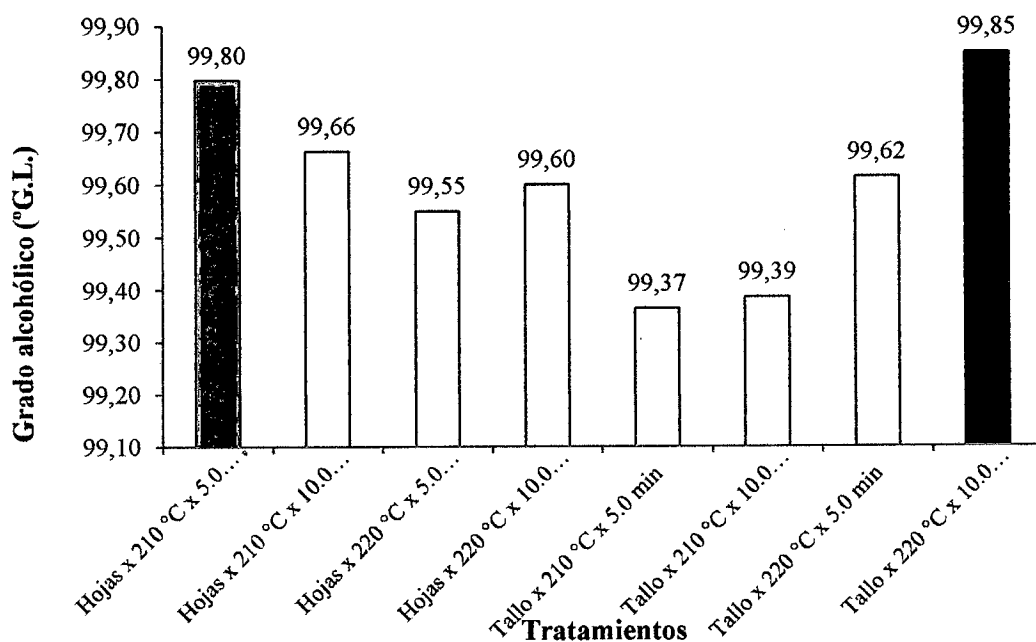


Gráfico 3.15. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el grado alcohólico (°GL.), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.2. Determinación de Densidad (g.cm^{-3})

Según en el **Anexo 3.2**, se reportan los datos experimentales obtenidos para la densidad (g.cm^{-3}), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la densidad (g.cm^{-3}), **cuadro 3.9**, se aprecia que no existe significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 0.94 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se detalla en el **cuadro 3.10**, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 0.8454 y 0.8477 g.cm^{-3} , fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.10**, se indica que a temperaturas de 210 y 220°C se obtuvo 0.8446 y 0.8485 g.cm^{-3} , los cuales fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizado el análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.10**, se indica que con los tiempos de extracción por vapor a 5.00 y 10.00 min se obtuvieron 0.8465 y 0.8466 g.cm^{-3} , los cuales fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuado el análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.10**, expresa que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, detalla que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 0.8468, 0.8443, 0.8453 y 0.8453 g.cm^{-3} , fueron estadísticamente iguales.

El efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor expresa que el tratamiento $S_2T_2P_1$ al lograr 0.8503g.cm^{-3} , fue estadísticamente igual a los tratamientos $S_2T_2P_2$ y $S_2T_1P_2$ que obtuvieron 0.8477 y 0.8465g.cm^{-3} , y superó al tratamiento $S_2T_1P_1$ que obtuvo 0.8408g.cm^{-3} respectivamente.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.10**, indica que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, detalla que, en la comparación vertical los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$; y $S_1T_2P_2$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 0.8468 y 0.8408 , 0.8443 y 0.8465 , 0.8453 y 0.8533 ; y 0.8453 y 0.8503g.cm^{-3} , fueron estadísticamente.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.10**, se determina que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 0.8468 , 0.8443 , 0.8453 y 0.8453g.cm^{-3} ; y los tratamientos $S_2T_2P_1$, $S_2T_2P_2$ y $S_2T_1P_2$ al lograr 0.8503 , 0.8477 y 0.8465g.cm^{-3} , son estadísticamente iguales tal y como se muestra en el **gráfico 3.16**.

Para Krestzschmar, (1961), las impurezas comúnmente presentes en los productos destilados que influyen en la densidad son: ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores.

Cuadro 3.9. Análisis de varianza para la densidad (g.cm^{-3}).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.00004	1	0.00004	0.66922	NO
Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$)	0.00012	1	0.00012	1.94020	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.00000	1	0.00000	0.00049	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$))	0.00014	1	0.00014	2.19439	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.00001	1	0.00001	0.21558	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.00002	1	0.00002	0.30552	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.00006	1	0.00006	0.98990	NO
Error	0.00153	24	0.00006		
Total	0.00194	31			

CV = 0.94%

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.10. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor ($^{\circ}\text{C}$) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de densidad (g.cm^{-3}).

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato		
	210 °C				220 °C						
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor						
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min				
Hojas	0.8468	Aa	0.8443	Aa	0.8453	Aa	0.8453	Aa	0.8454	a	
Tallo	0.8408	Ba	0.8465	ABa	0.8533	Aa	0.8503	ABa	0.8477	a	
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor											
			210 °C =	0.8446	A				220 °C =	0.8485	A
Efecto Tiempo de Extracción por Vapor											
			5.0 min =	0.8465	A				10.0 min =	0.8466	A
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas											
Comparaciones verticales : Letras minúsculas											

Fuente: Elaboración Propia.

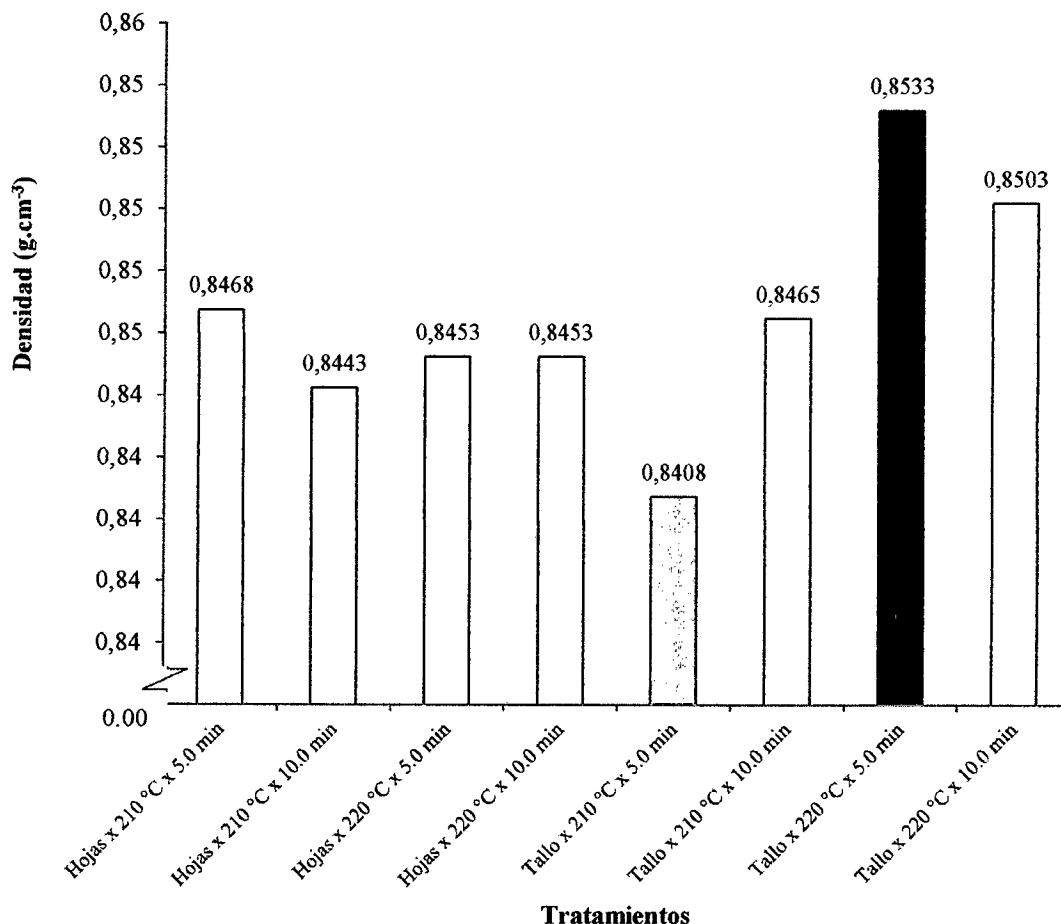


Gráfico 3.16. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la densidad (g.cm⁻³), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.3. Determinación de pH

En el **Anexo 3.3**, se reportan los datos experimentales de la densidad (mg.cm⁻³), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para el pH, tal y como se aprecia en el **cuadro 3.11**, que no existe significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 2.19 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

Efectuada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.12**, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido un pH de 7.8416 y 7.8750, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.12**, indica que a temperaturas de 210 y 220°C se obtuvo un pH de 7.8219 y 7.8947, los cuales fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 3.12**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, se indica que los tiempos de extracción por vapor de 5.00 y 10.00 min obteniendo valores de 7.8653 y 7.8513 pH, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Analizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa **cuadro 3.12**, se expresa que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, determinó que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron un pH de 7.7325, 7.8000, 7.9213 y 7.9125, fueron estadísticamente iguales.

Del mismo modo el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron un pH de 7.9925, 7.7625, 7.8150 y 7.9300, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Al analizar la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.12**, expresa que la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, que, en la comparación vertical de los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y

S₂T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₂T₂P₁; y S₁T₂P₂ y S₂T₂P₂ obtuvieron pH de 7.7325 y 7.9925, 7.8000 y 7.7625, 7.9213 y 7.8150; y 7.9300 y 7.9125; fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 3.12**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, expresa que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂, S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂ son estadísticamente iguales.

Para Palmqvist *et al.*, (1999), el descenso del pH en el etanol se debe a presencia del ácido acético generado durante la fermentación y que en su mayoría son separados durante la destilación.

Cuadro 3.11. Análisis de varianza para el pH.

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.0089	1	0.0089	0.3014	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	0.0424	1	0.0424	1.4292	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.0016	1	0.0016	0.0533	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.0484	1	0.0484	1.6322	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0151	1	0.0151	0.5086	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0361	1	0.0361	1.2169	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0887	1	0.0887	2.9898	NO
Error	0.7122	24	0.0297		
Total	0.9535	31			

CV = 2.19%

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.12. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el pH.

Factor A =		Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato	
Tipo sustrato	210 °C				220 °C						
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor						
	5.0 min	10.0 min	5.0 min	10.0 min	5.0 min	10.0 min	5.0 min	10.0 min			
Hojas	7.7325	Aa	7.8000	Aa	7.9213	Aa	7.9125	Aa	7.8416	a	
Tallo	7.9925	Aa	7.7625	Aa	7.8150	Aa	7.9300	Aa	7.8750	a	
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =		7.8219		A		220 °C = 7.8947		A
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =		7.8653		A		10.0 min = 7.8513		A
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas								
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas								

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.4. Determinación de Alcoholes Superiores(ppm Alcoholes Superiores)

En el **Anexo 3.4**, se reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), en el **cuadro 3.13**, se aprecia que solo existe significación estadística para temperaturas de extracción por vapor, sin embargo no existe significación estadística para el tipo sustrato, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 17.68 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro3.14**, la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 227.73 y 211.36 ppm Alcoholes Superiores, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.14**, expresa que a temperatura de 210°C se obtuvo 202.03 ppm Alcoholes Superiores, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 237.06 ppm Alcoholes Superiores, tal y como se muestra en el **gráfico 3.17**.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.14**, se observó que con el tiempo de extracción por vapor a 5.00 min se obtuvo 212.76 ppm Alcoholes Superiores, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 10.00 min que obtuvo 237.06 ppm Alcoholes Superiores, tal y como se muestra en el **gráfico 3.18**.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 4.14**, se determinó que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 188.19 ppm Alcoholes Superiores, fue estadísticamente igual al tratamiento $S_1T_1P_2$ que obtuvo 207.58 ppm Alcoholes Superiores, y superó a los tratamientos $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 245.62 y 269.54 ppm Alcoholes Superiores, respectivamente.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ al lograr 201.27, 211.08, 215.97 y 217.13 ppm Alcoholes Superiores fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

De la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.12**, se determinó que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, indica que, en la comparación vertical los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, y $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$ al obtener 188.19 y 201.27, y 207.58 y 211.08 ppm Alcoholes Superiores, fueron estadísticamente iguales. Sin embargo $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ obtuvieron 215.97 y 217.13 ppm Alcoholes Superiores, y superaron a los tratamientos

$S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 245.62 y 269.54 ppm Alcoholes Superiores, respectivamente.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.14**, indica que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio, el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 188.19 ppm Alcoholes Superiores superó estadísticamente a todos los tratamiento estudiados.

Según Villanueva, (1997), el aceite fusel es una capa aceitosa que se forma en la fermentación y destilación, es una sustancia de alto punto de ebullición (90 a 125 °C), y está formado a partir de diferentes sustratos fermentables, puesto que, la concentración baja se debe a que en la fermentación llega como máximo a temperatura de 80°C. Por lo tanto al considerar a los alcoholes superiores una impureza del etanol, el mejor tratamiento fue el tratamiento $S_1T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 3.19**.

Cuadro 3.13. Análisis de varianza para la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sig .
Tipo de sustrato	2144.1791	1	2144.1791	1.4226	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	9818.8509	1	9818.8509	6.5146	*
Tiempo de extracción por vapor (min)	1472.8209	1	1472.8209	0.9772	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	4866.2618	1	4866.2618	3.2287	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	522.9846	1	522.9846	0.3470	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	8.4401	1	8.4401	0.0056	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	86.8456	1	86.8456	0.0576	NO
Error	36172.7712	24	1507.1988		
Total	55093.1543	31			
			CV =	17.68%	

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.14. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	188.19	Aa	207.58	ABa	245.62	B b	269.54	B b	227.73	a
Tallo	201.27	Aa	211.08	Aa	215.97	Aa	217.13	Aa	211.36	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =	202.03	A			220 °C =	237.06	B
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =	212.76	A			10.0 min =	226.33	B
Comparaciones horizontales		: Letras mayúsculas								
Comparaciones verticales		: Letras minúsculas								

Fuente: Elaboración Propia.

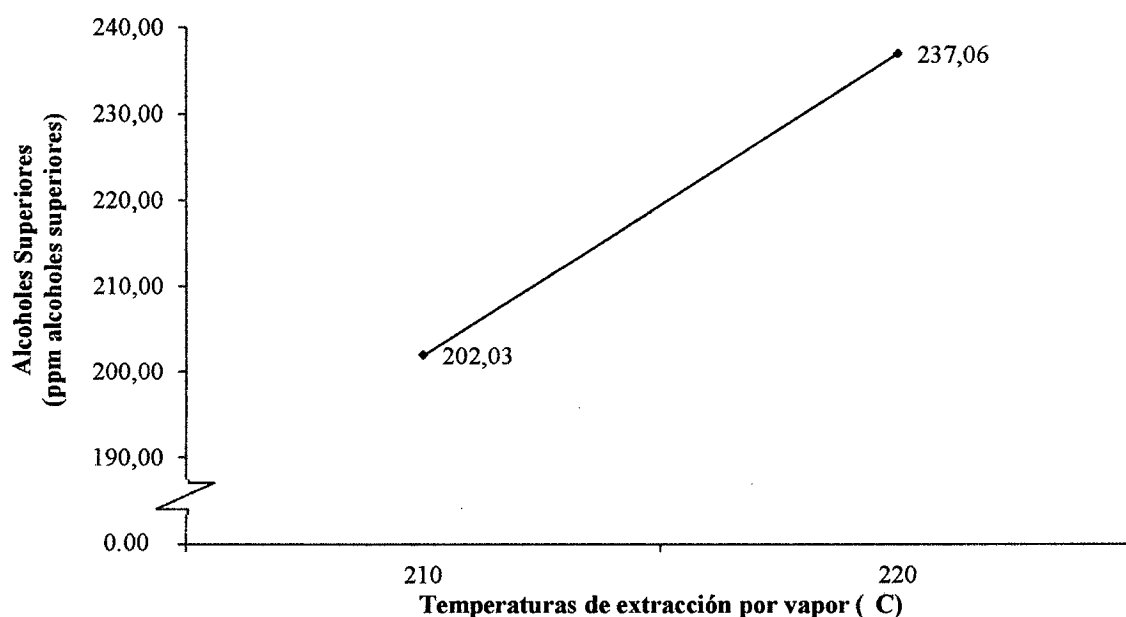


Gráfico 3.17. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

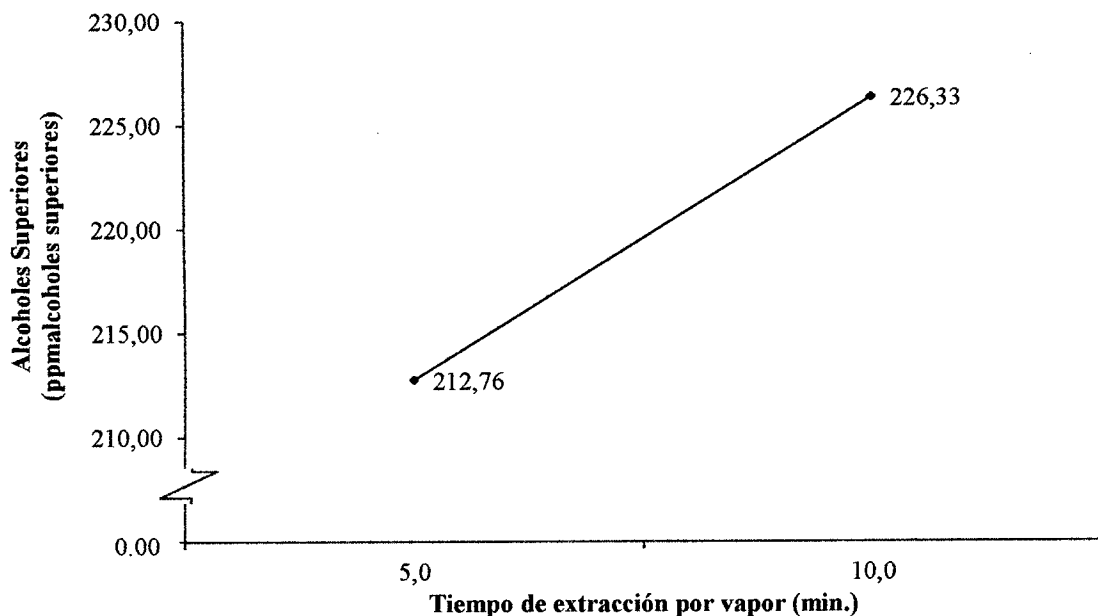


Gráfico 3.18. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

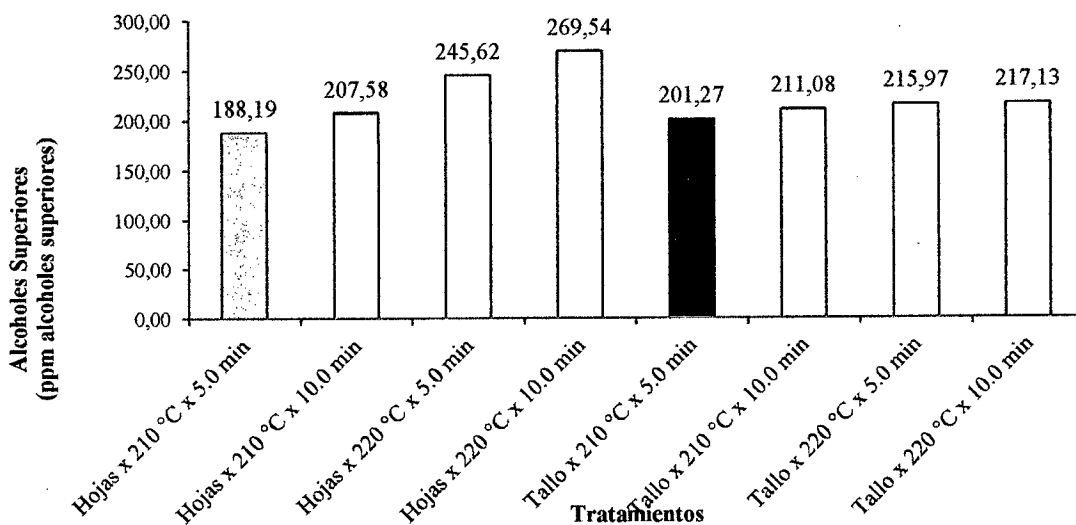


Gráfico 3.19. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min.)), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.5. Determinación de Aldehídos (ppm Furfural)

Jönsson *et al.*, (1998) menciona que como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pre tratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa), entre los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos se encuentran: reducción de la tasa de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica de etanol y disminución de la producción de biomasa. La inhibición que el furfural ejerce sobre el alcohol podría explicar la excreción de acetaldehído observada durante las primeras horas de la fermentación (Palmqvist *et al.*, 1998).

En el **Anexo 3.5**, se reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), del etanol obtenido en el estudio.

En el análisis de varianza, **cuadro 3.15**, se aprecia que solo existe alta significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor y la interacción tipo sustrato por temperaturas de extracción con vapor. El coeficiente de variabilidad fue 5.59 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 3.16**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, se visualiza que el sustrato hoja y tallo obtuvieron 5.90 y 6.12 ppm Furfural y fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.16** y **gráfico 3.20**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 5.72 ppm Furfural, y superó estadísticamente a la temperatura de 220 °C que obtuvo 6.30 ppm Furfural.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.16**, se expresa que con el tiempo extracción por vapor de 5.00 min se obtuvo 5.78 ppm Furfural, y superó estadísticamente al tiempo de 10.00 min que obtuvo 6.24ppm Furfural, ver **gráfico 3.21**.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.16**, se determinó que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, se expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ al lograr 5.66, 5.90 y 5.64 ppm Furfural, fueron estadísticamente iguales y superaron al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 6.41 ppm Furfural, respectivamente.

El sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ con 5.47 ppm Furfural, superó estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 5.86 y 6.36 ppm Furfural que fueron iguales, y superaron al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 6.79 ppm Furfural.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.16**, expresa que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato indica, que en la comparación vertical los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, y $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$ al obtener 5.66 y 5.47, y 5.90 y 5.86 ppm Furfural, fueron estadísticamente iguales. Sin embargo $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ obtuvieron 5.64 y 6.41 ppm Furfural, superaron al tratamiento $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 6.36 y 6.79 ppm Furfural.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.16**, se expresa que la interacción Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, en promedio el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 5.47 ppm Furfural, superó estadísticamente a todos los tratamiento estudiados. Por lo tanto, según Kretschmar, (1961) al considerar el Furfural una impureza del etanol, los mejores tratamientos son $S_2T_1P_1$ tal y como se muestra en el **gráfico 3.22**.

Cuadro 3.15. Análisis de varianza para la concentración de aldehídos (ppm Furfural).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sig.
Tipo de sustrato	0.3825	1	0.3825	3.3913	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	2.6983	1	2.6983	23.9240	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	1.6728	1	1.6728	14.8319	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.9025	1	0.9025	8.0019	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0165	1	0.0165	0.1467	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.1687	1	0.1687	1.4960	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.1220	1	0.1220	1.0816	NO
Error	2.7069	24	0.1128		
Total	8.6702	31			
			CV =	5.59%	

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.16. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A = Tipo sustrato	210 °C					220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor					Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min			5.0 min		10.0 min		
Hojas	5.66	Aa	5.90	Aa	5.64	Aa	6.41	Ba	5.90	a
Tallo	5.47	Aa	5.86	Ba	6.36	BCb	6.79	Cb	6.12	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =	5.72	A	220 °C =	6.30	B		
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =	5.78	A	10.0 min =	6.24	B		
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas							
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas							
Fuente: Elaboración Propia.										

Fuente: Elaboración Propia.

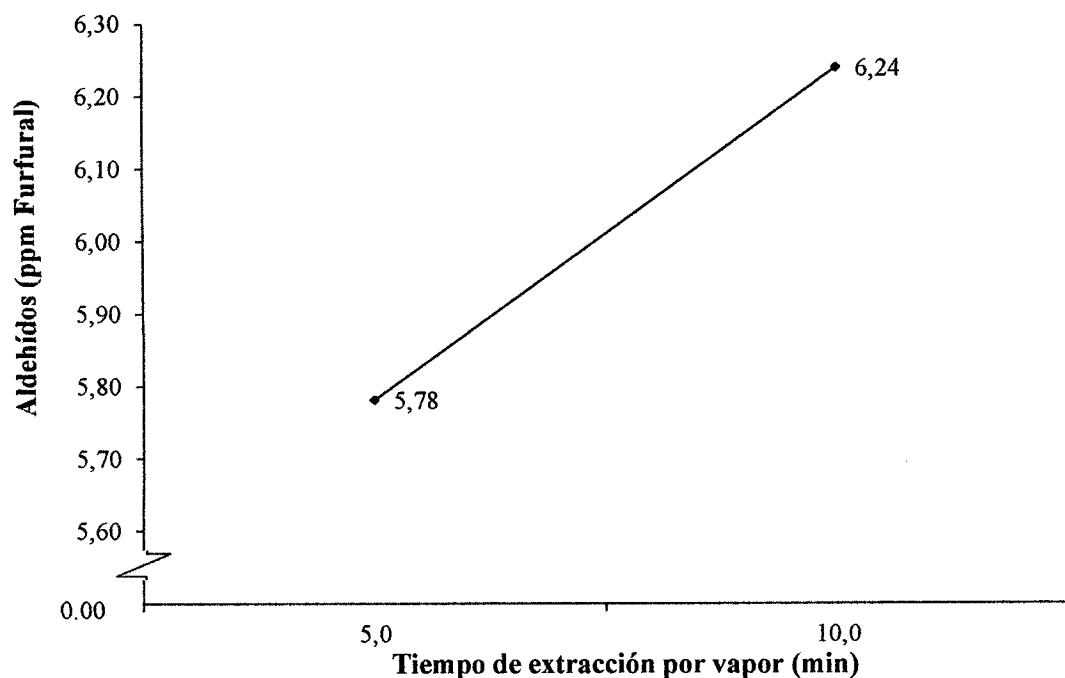


Gráfico 3.20. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

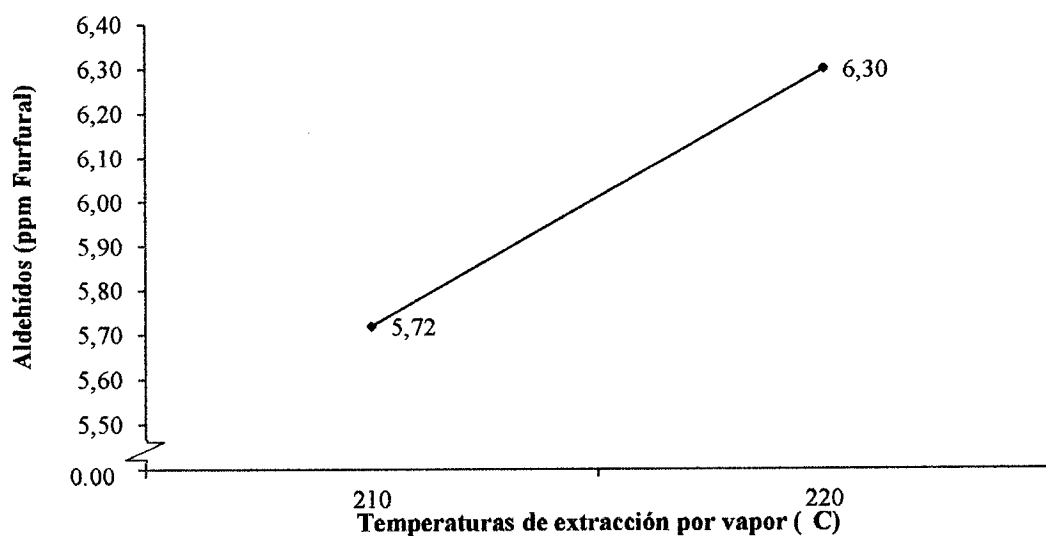


Gráfico 3.21. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

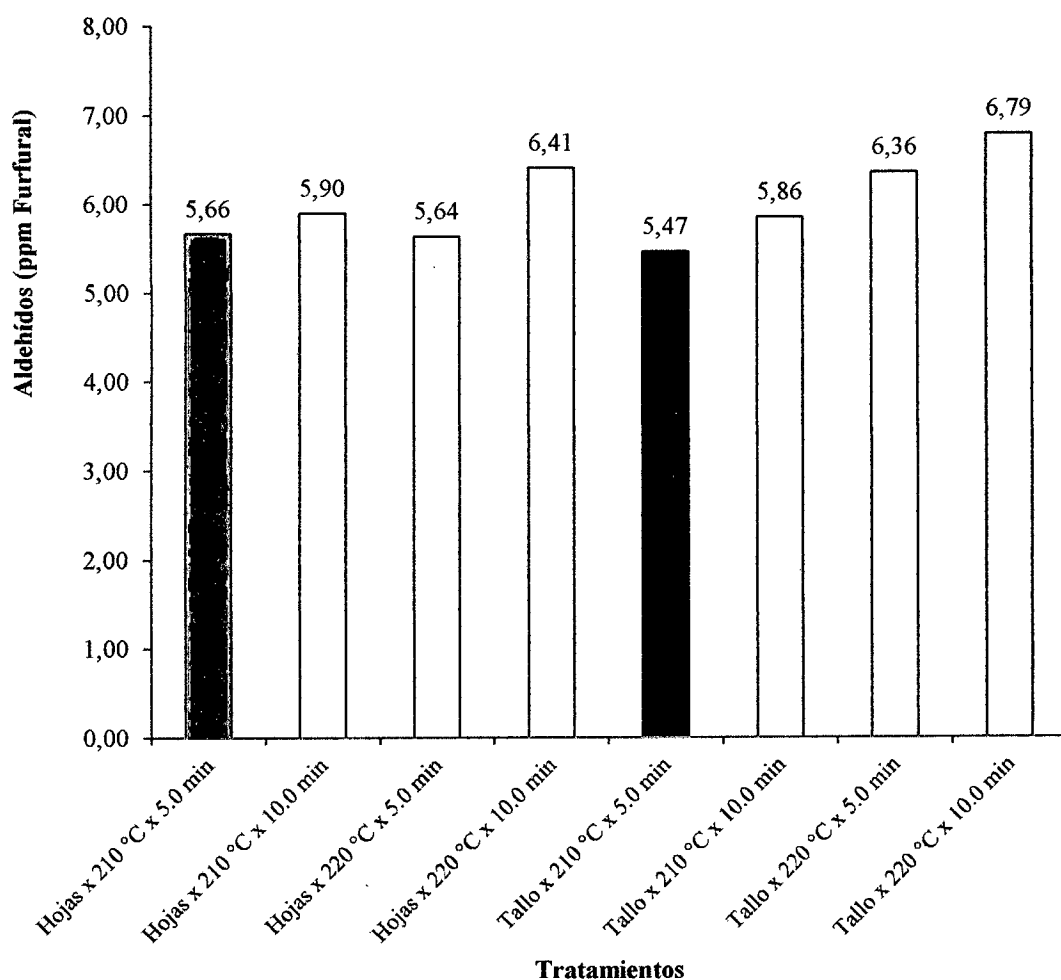


Gráfico 3.22. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.6. Determinación de Acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹)

Los anexos 3.6 y 3.7, reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹), en el **cuadro 3.17**, se aprecia que solo existe alta significación estadística para las temperaturas, periodo de tiempo de extracción con vapor y la interacción tipo sustrato por temperaturas de extracción con vapor por periodo de tiempo de extracción con vapor. El coeficiente de variabilidad fue 8.33 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

Efectuada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.18**, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 47.9446 y 48.6897 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.18**, se determinó que a temperatura de 210°C se obtuvo 42.6457 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, y superó estadísticamente a la temperatura de 220 °C que obtuvo 53.9886 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, ver **gráfico 3.23**.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.18 y gráfico 3.24**, indica que con el tiempo extracción por vapor de 5.00 min se obtuvo 45.1000 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 10.00 min que obtuvo 51.5342 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.18**, al estudiar el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, se expresa que el tratamiento S₁T₁P₁ al lograr 37.7872 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, superó estadísticamente a los tratamientos S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂ que obtuvieron 47.9114, 50.2029 y 55.8767 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹ y fueron estadísticamente iguales, respectivamente.

El efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, expresa que el tratamiento S₂T₁P₁ al lograr 41.8753 mg Ácido

Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, fue estadísticamente igual al tratamiento S₂T₁P₂ que obtuvo 43.0087 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, fue igual a S₂T₂P₁ que obtuvo 50.5347 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, y este último igual a S₂T₂P₂ que obtuvo 59.3401 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

En el análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.18**, expresa que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, indica que, en la comparación vertical los tratamientos S₁T₁P₁ y S₂T₁P₁, S₁T₁P₂ y S₂T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₂T₂P₁; y S₁T₂P₂ y S₂T₂P₂ al obtener 37.7872 y 41.8753, 47.9114 y 43.0087, 50.2029 y 50.5347; 55.8767 y 59.3401 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 3.18**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, se expresa que, en promedio el tratamiento S₁T₁P₁ y S₂T₁P₁ al lograr 37.7872 y 41.8753 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹ superó a los demás tratamientos estudiados.

Para Tomas *et al.*, (2009), el ácido acético originado a partir de la hidrólisis de los grupos acetilo de la fracción hemicelulósica, es el compuesto mayoritario, su concentración aumentó cuanto mayor fue la temperatura de pre tratamiento. Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar, (1961), al considerar que el ácido acético es una impureza del etanol, el mejor tratamientos es S₁T₁P₁, tal y como se muestra en el **gráfico 3.25**.

Cuadro 3.17. Análisis de varianza para la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	4.4418	1	4.4418	0.2740	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	1029.2954	1	1029.2954	63.4897	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	331.1942	1	331.1942	20.4289	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	10.6250	1	10.6250	0.6554	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	17.1650	1	17.1650	1.0588	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	5.1894	1	5.1894	0.3201	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	73.4754	1	73.4754	4.5322	**
Error	389.0883	24	16.2120		
Total	1860.4744	31			
		CV =	8.33%		

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.18. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹).

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	37.7872	Aa	47.9114	Ba	50.2029	Ba	55.8767	Ba	47.9446	a
Tallo	41.8753	Aa	43.0087	ABa	50.5347	BCa	59.3401	Ca	48.6897	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor				210 °C =	42.6457	A	220 °C =	53.9886	B	
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor				5.0 min =	45.1000	A	10.0 min =	51.5342	B	
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas										
Comparaciones verticales : Letras minúsculas										
Fuente: Elaboración Propia.										

Fuente: Elaboración Propia.

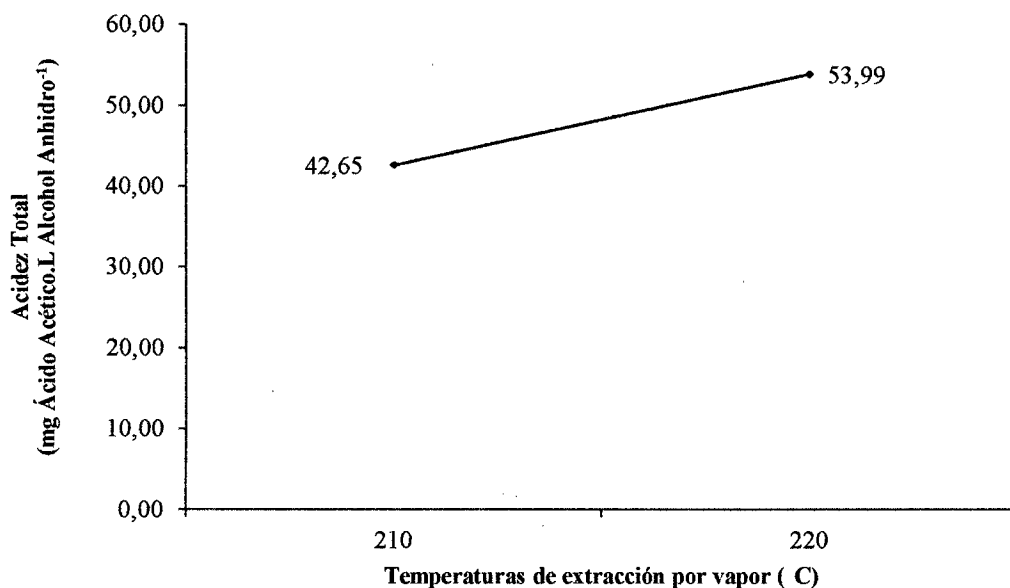


Gráfico 3.23. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia

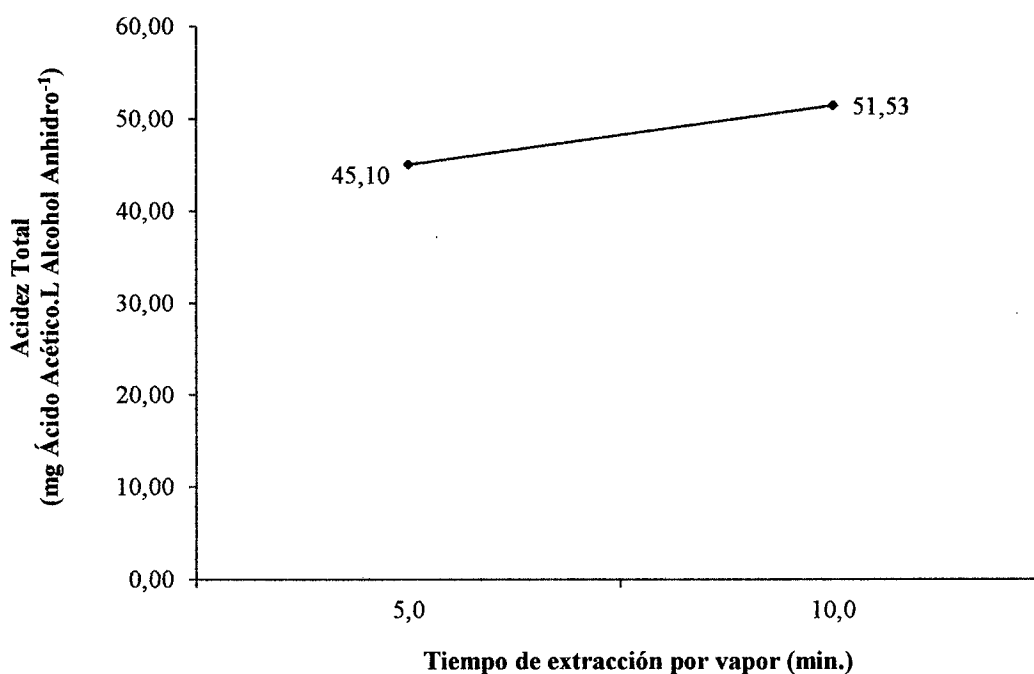


Gráfico 3.24. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro-1), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia

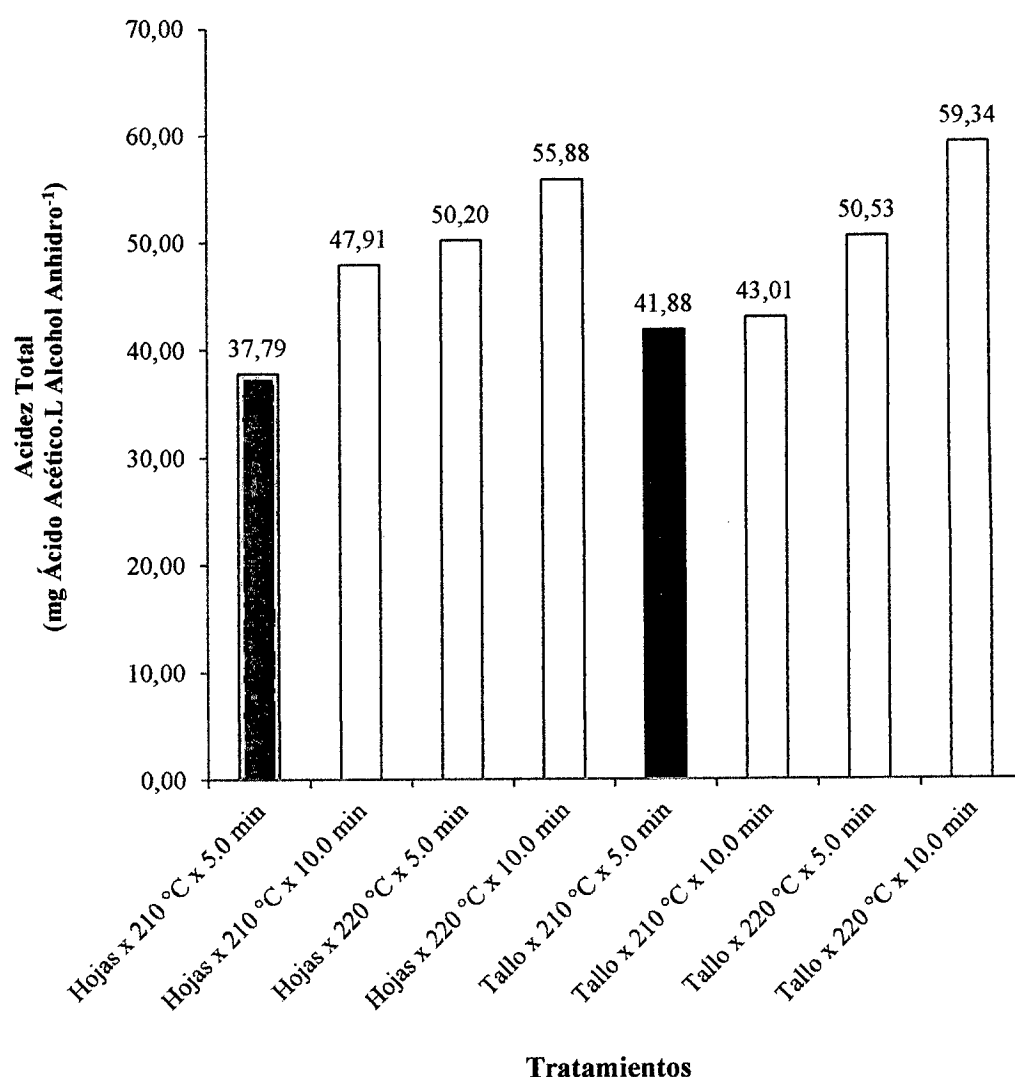


Gráfico 3.25. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro-1) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.7. Determinación de Esteres (ppm Acetato de Etilo)

El **Anexo 3.8**, reporta los datos experimentales obtenidos para la concentración de Esteres (ppm Acetato de Etilo), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Esteres (ppm Acetato de Etilo), en el **cuadro 3.19**, se aprecia que existe alta significación estadística para Temperaturas, Tiempo de extracción por vapor y la interacción Tipo sustrato por Temperaturas de extracción con vapor. El coeficiente de variabilidad fue 3.61 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 3.20**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 278.94 y 275.24 ppm Acetato de Etilo, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.20 y gráfico 3.26**, indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 256.25 ppm Acetato de Etilo, y superó estadísticamente a la temperatura de 220 °C que obtuvo 297.93 ppm Acetato de Etilo.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.20**, se indica que con el tiempo extracción por vapor de 5.00 min se obtuvo 270.43 ppm Acetato de Etilo, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 10.00 min que obtuvo 283.75 ppm Acetato de Etilo. Tal y como se muestra en el **gráfico 3.27**

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.20**, se expresa el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, que el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 262.46 ppm Acetato de Etilo, fue estadísticamente igual a los tratamientos $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ que obtuvieron 267.57 y 285.26 ppm Acetato de Etilo, y superó al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 300.46 ppm Acetato de Etilo, sin embargo este último es igual a $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$.

En el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ al lograr 242.91, 252.07, 291.09 y 314.90 ppm Acetato de Etilo, fueron estadísticamente iguales

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.20**, se indica que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, determina que, en la comparación vertical los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 242.91, 252.07 y 300.46 ppm Acetato de Etilo, superaron estadísticamente a los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_2P_2$ con 262.46, 267.57 y 314.90 ppm Acetato de Etilo; sin embargo $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 285.26 y 291.09 ppm Acetato de Etilo resultaron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, como se observa en el **cuadro 3.20**, se determinó que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, que, en promedio los tratamientos $S_2T_1P_1$ y $S_2T_1P_2$ al lograr 242.91 y 252.07 ppm Acetato de Etilo, superaron estadísticamente a todos los tratamiento estudiados.

Elobeid A. *et al.*, (2011), reporta que el acetato de metilo y etilo son ésteres de mayor proporción que ascienden y son arrastrados con el producto debido a su temperatura de ebullición que es de 57 y 77°C, respectivamente; y que son sales alcohólicas, tanto de ácidos orgánicos como inorgánicos, su mayor producción es a partir de alcohol etílico según Rankine, (1995). También es posible que se haya arrastrado la totalidad de ésteres. Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar, (1961), al considerar a los esterres una impureza del etanol, los mejores tratamientos son $S_2T_1P_1$ y $S_2T_1P_2$, tal y como se muestra en el **gráfico 3.28**.

Cuadro 3.19. Análisis de varianza para la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	109.3657	1	109.3657	1.0941	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	13892.6986	1	13892.6986	138.9866	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	1419.5235	1	1419.5235	14.2013	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	1530.2123	1	1530.2123	15.3087	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	80.1918	1	80.1918	0.8023	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	306.0051	1	306.0051	3.0614	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	10.3167	1	10.3167	0.1032	NO
Error	2398.9698	24	99.9571		
Total	19747.2836	31			

CV = 3.61%

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.20. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor											
Factor A = Tipo sustrato	210 °C					220 °C				Efecto Tipo Sustrato	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor					Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min			5.0 min		10.0 min			
Hojas	262.46	A b	267.57	AB b		285.26	ABa	300.46	Ba	278.94	a
Tallo	242.91	Aa	252.07	A a		291.09	Ba	314.90	Bb	275.24	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C = 256.25 A			220 °C = 297.93 B					
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min = 270.43 A			10.0 min = 283.75 B					
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas								
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas								

Fuente: Elaboración Propia.

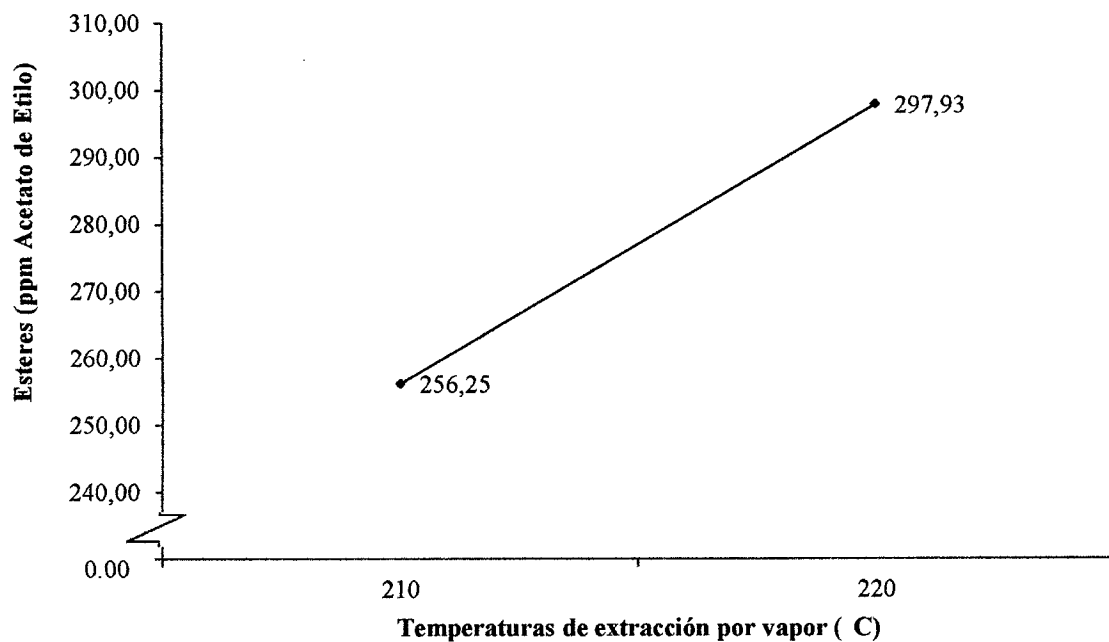


Gráfico 3.26. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

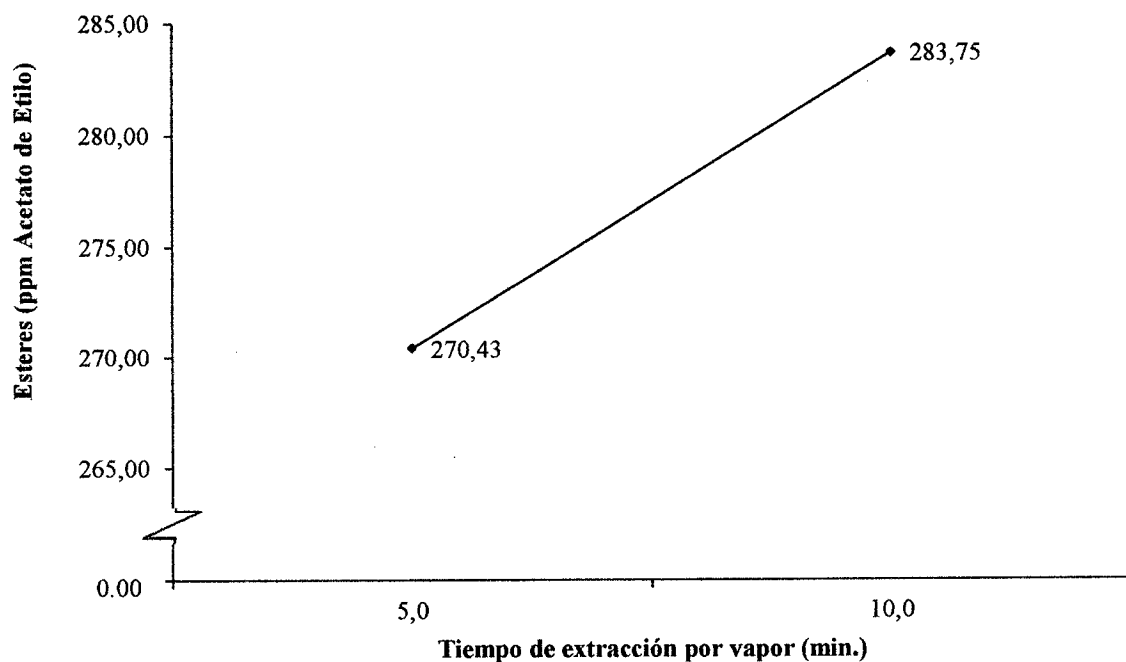


Gráfico 3.27. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo), del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

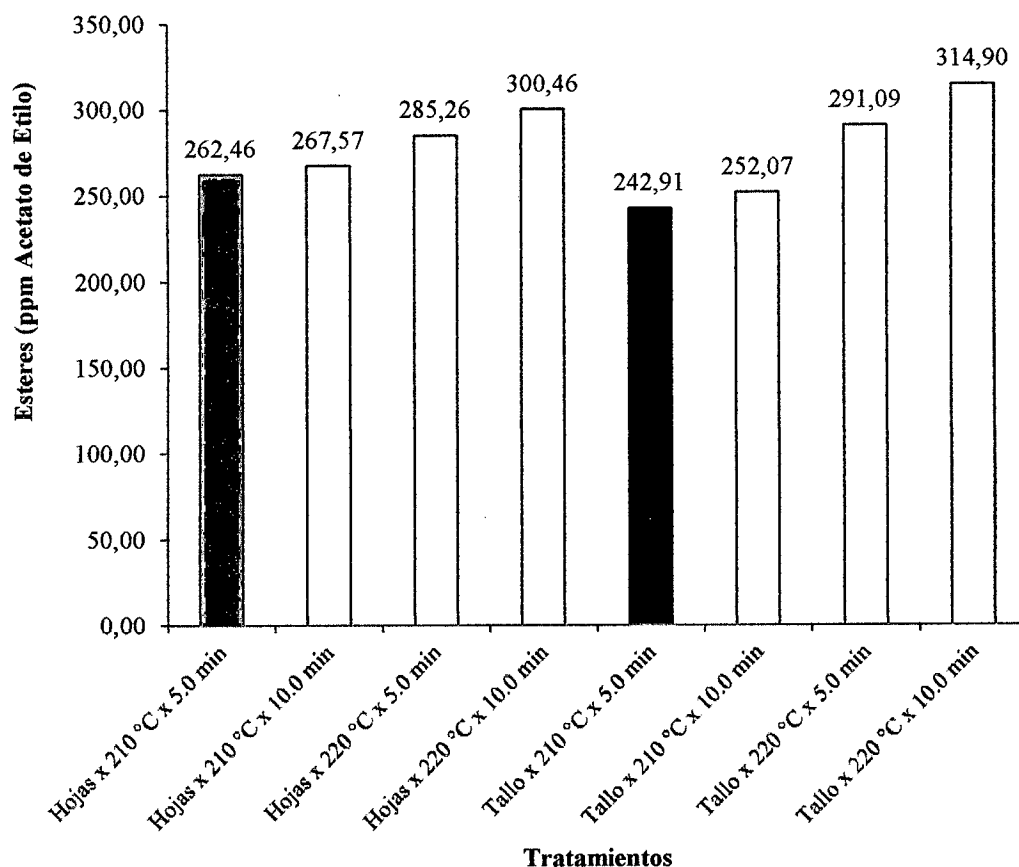


Gráfico 3.28. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

3.6.8. Determinación de Metanol (ppm metanol)

El **Anexo 3.9**, se reporta los datos experimentales obtenidos para la concentración de Metanol (ppm metanol), para las muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el **cuadro 3.21**, el análisis de varianza para la concentración de Metanol (ppm metanol), se aprecia que existe alta significación estadística para el Tipo sustrato, Temperaturas de extracción con vapor y la interacción Tipo sustrato por Temperaturas de extracción con vapor. El coeficiente de variabilidad fue 40.44 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 3.22**, de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, se observa que el sustrato hoja al haber obtenido 32.24 ppm metanol, superó estadísticamente al sustrato tallo que obtuvo 267.86 ppm metanol, tal y como se muestra en el **gráfico 3.29**.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

En la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.22 y gráfico 3.30**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 113.92 ppm metanol, y superó estadísticamente a la temperatura de 220 °C que obtuvo 186.17 ppm metanol.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.22**, se indica que con el tiempo extracción por vapor de 5.00 min se obtuvo 143.96 ppm metanol, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor de 10.00 min que obtuvo 156.13 ppm metanol y se visualiza en el **gráfico 3.31**

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.22**, se indica que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al lograr 27.61, 31.17, 33.32 y 36.85 ppm metanol, fueron estadísticamente iguales.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 191.47 ppm metanol, fue estadísticamente igual a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 205.45 y 323.46 ppm metanol, y superó al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 351.06 ppm metanol, sin embargo este último es igual a $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Del análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, **cuadro 3.22**, se indica que el efecto de la Temperatura y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, que, en la comparación vertical los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 27.61, 31.17, 33.32 y 36.85 ppm metanol superaron estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron 191.47, 205.45, 323.46 y 351.06 ppm metanol.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el análisis de la Prueba de Duncan al 0.05% de probabilidad, en el **cuadro 3.22**, se indica que la interacción entre Tipo de sustrato por Temperatura de extracción por Periodo de Tiempo de Extracción con Vapor, que en promedio el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 27.61 ppm metanol superó a todos los tratamiento estudiados.

Según Matissek, (1998), sostiene que cuando se fermentan mostos sin filtrar (presencia de madera) el contenido de metanol es mayor y porque estos se forman a partir de pectinas. Por ello, existe presencia de metanol en los tratamientos; pero cuando se concentran las pectinas sufren modificaciones o desnaturalización. El bajo contenido de metanol se puede deber a que la destilación se realizó a 78.4 °C, que es la temperatura de ebullición del etanol, y esta temperatura es mayor a la temperatura de ebullición del metanol que es 64.5 °C y tiene mayor valor de volatilidad que el etanol.

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar, (1961), al considerar al metanol una impureza del etanol, el mejor tratamientos es $S_1T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 3.32**.

Cuadro 3.21. Análisis de varianza para la concentración metanol (ppm metanol).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sig.
Tipo de sustrato	444149.6065	1	444149.6065	120.6007	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	41758.3747	1	41758.3747	11.3387	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	1184.5893	1	1184.5893	0.3217	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	35433.9483	1	35433.9483	9.6214	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	594.4786	1	594.4786	0.1614	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	92.1745	1	92.1745	0.0250	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	93.0213	1	93.0213	0.0253	NO
Error	88387.4627	24	3682.8109		
Total	611693.656	31			
			CV =	40.44%	

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3.22. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales

Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración metanol (ppm metanol)

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor									
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas	27.61	Aa	31.17	Aa	33.32	A a	36.85	Aa	32.24 a
Tallo	191.47	A b	205.45	AB b	323.46	AB b	351.06	B b	267.86 b
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C = 113.92 A		220 °C = 186.17 B				
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min = 143.96 A		10.0 min = 156.13 B				
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas						
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas						

Fuente: Elaboración Propia.

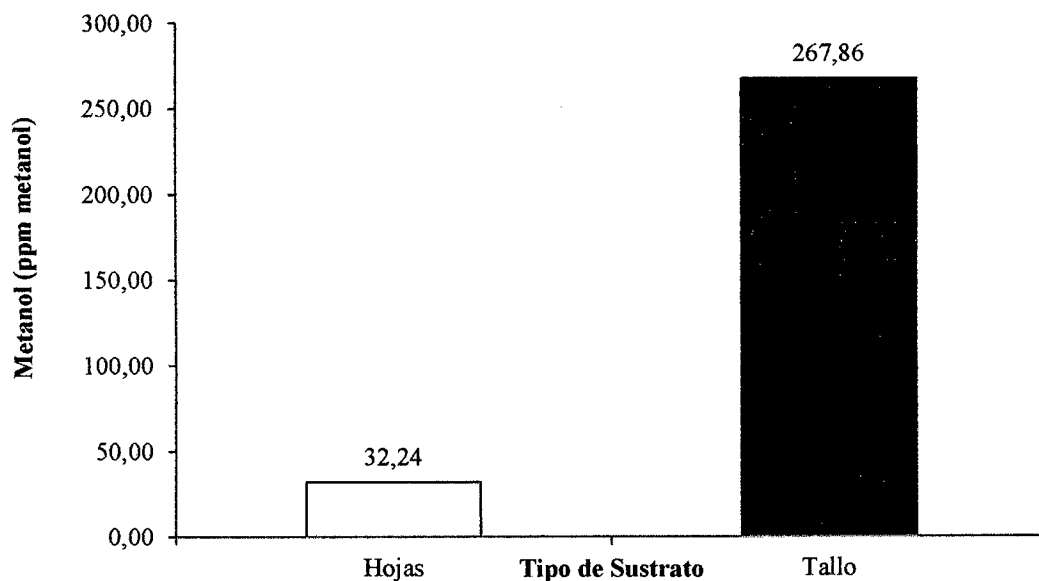


Gráfico 3.29. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

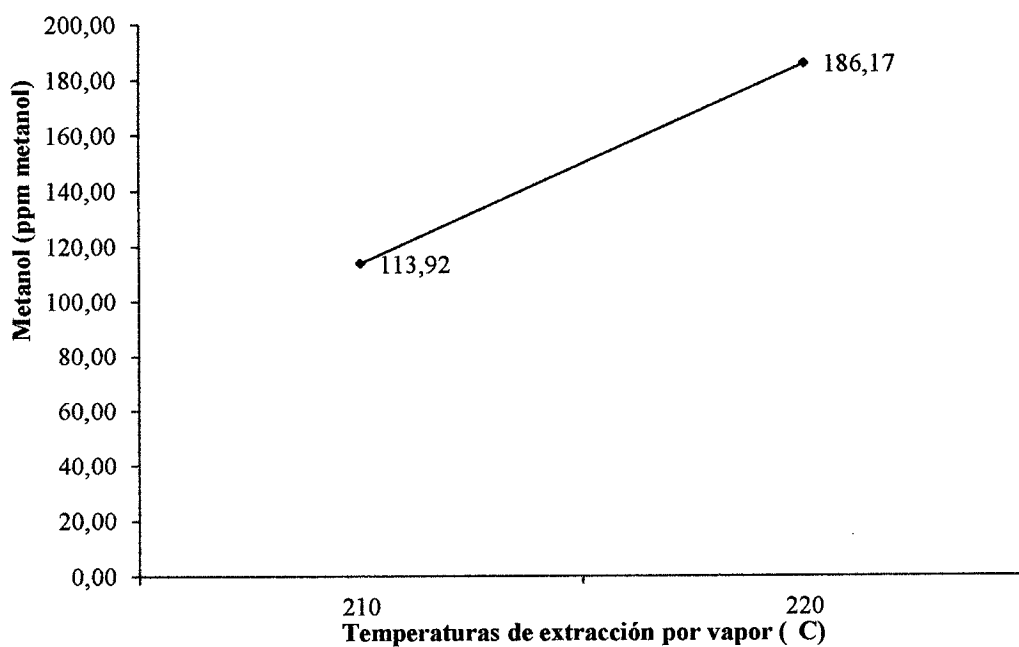


Gráfico 3.30. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

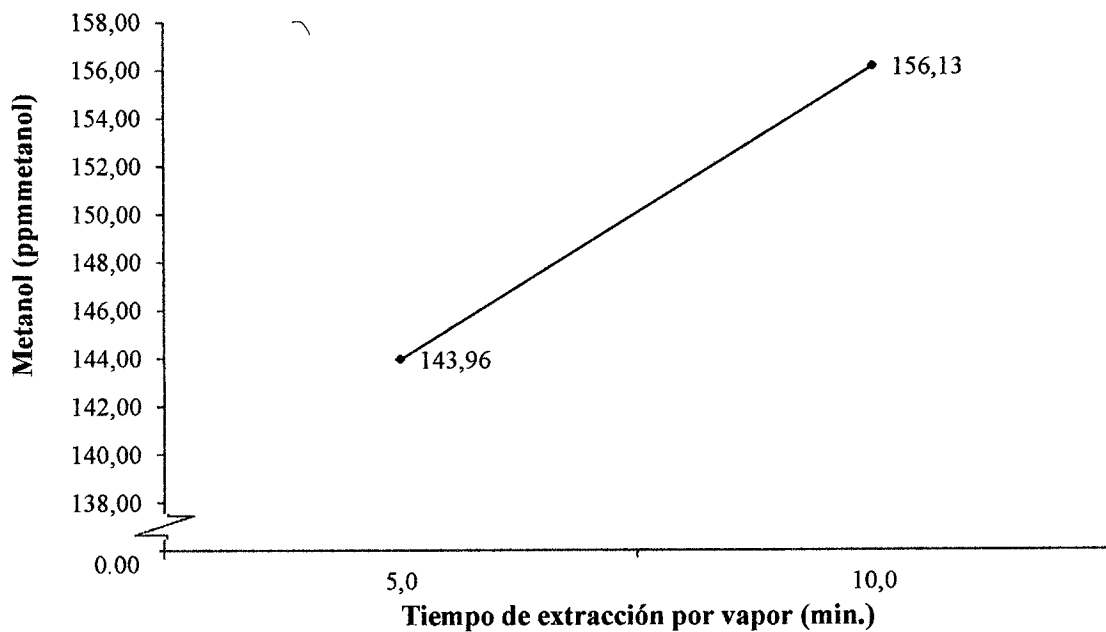


Gráfico 3.31. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

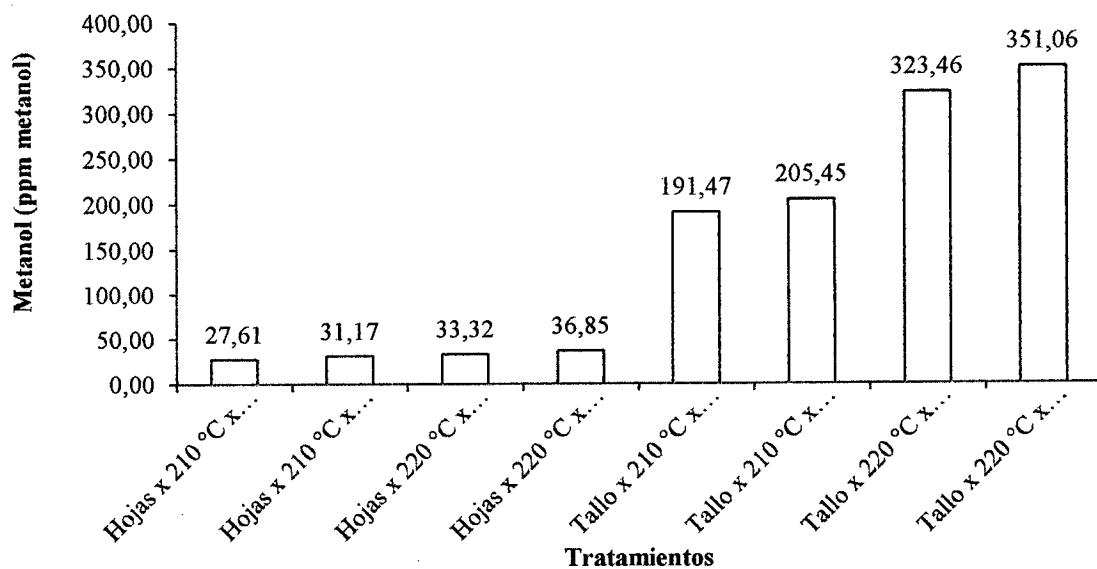


Gráfico 3.32. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min.)), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

Fuente: Elaboración Propia.

CONCLUSIONES

1. Los resultados del análisis físico químico de la biomasa lignocelulósica fueron:

Para tallos de caña de azúcar:

Humedad 73.54%, Grasa total 0.65%, Cenizas 3.17%, Fibra 22.54%, Fósforo 0.12%, Nitrógeno total 0.45%, Celulosa 41.30%, Hemicelulosa 25.50%, Lignina 29.70% y pH 5.67%.

Para hojas de caña de azúcar:

Humedad 72.38%, Grasa total 0.94%, Cenizas 2.00%, Fibra 18.07%, Fósforo 0.21%, Nitrógeno total 0.17%, Celulosa 36.80%, Hemicelulosa 21.00%, Lignina 28.00% y pH 4.76%.

2. Las variaciones de las concentraciones de sólidos solubles para los tratamientos en estudio fueron:

Tratamientos de hojas de caña de azúcar:

Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_1T_1P_1$) = 4.54 °Brix, Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_1T_1P_2$) = 5.53 °Brix, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 5 min. ($S_1T_2P_1$) = 4.65 °Brix, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_1T_2P_2$) = 5.52 °Brix.

Tratamientos de tallos de caña de azúcar:

Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_2T_1P_1$) = 4.68 °Brix, Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_2T_1P_2$) = 5.01 °Brix, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 5 min. ($S_2T_2P_1$) = 4.07 °Brix, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_2T_2P_2$) = 4.93 °Brix.

3. Las variaciones de pH para los tratamientos en estudio fueron:

Tratamientos de hojas de caña de azúcar

Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_1T_1P_1$) = **1.39 pH**, Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_1T_1P_2$) = **1.09 pH**, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 5 min. ($S_1T_2P_1$) = **1.20 pH**, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_1T_2P_2$) = **1.13 pH**.

Tratamientos de tallos de caña de azúcar

Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_2T_1P_1$) = **1.66 pH**, Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_2T_1P_2$) = **1.62 pH**, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 5 min. ($S_2T_2P_1$) = **1.42 pH**, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_2T_2P_2$) = **1.44 pH**.

4. Las variaciones de acidez (expresados en % Ac. Sulfúrico) para los tratamientos en estudio fueron:

Tratamientos de hojas de caña de azúcar

Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_1T_1P_1$) = **0.54 % ác. Sulfúrico**, Sustrato hoja x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_1T_1P_2$) = **0.97 % ác. Sulfúrico**, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 5 min. ($S_1T_2P_1$) = **0.77 % ác. Sulfúrico**, Sustrato hoja x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_1T_2P_2$) = **0.81 % ác. Sulfúrico**.

Tratamientos de tallos de caña de azúcar

Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 5 min. ($S_2T_1P_1$) = **0.76 % ác. Sulfúrico**, Sustrato tallo x temperatura de 210°C x 10 min. ($S_2T_1P_2$) = **1.04 % ác. Sulfúrico**, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_2T_2P_1$) = **0.80 % ác. Sulfúrico**, Sustrato tallo x temperatura de 220°C x 10 min. ($S_2T_2P_2$) = **0.80 % ác. Sulfúrico**.

5. El tiempo óptimo de fermentación óptimo fue de 72 h y el tratamiento de mayor rendimiento de producción de etanol fue S₂T₁P₁ (Sustrato tallos x Temperatura de 210°C x Periodo de tiempo de 5 min.) con un promedio de producción de 1570.43 ml de etanol/kg de sustrato.
6. En el análisis de calidad realizado al bioetanol obtenido a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*. L.), producido por extracción con vapor según los tratamientos evaluados cumplen con los rangos establecidos por INDECOPI en la Norma Técnica Peruana N° 321.126.2011, para etanol anhidro no desnaturalizado. Destacando los tratamiento Tallo x 210 °C x 5.0 min y Hojas x 210 °C x 5.0 min al obtener mejores resultados.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio de las diversas opciones de residuos agrícolas para la generación de energías renovables, por ser materias primas que garantizan mantener la soberanía alimentaria, diversidad del suministro energético y la posibilidad de obtener servicios de energía sin impacto ambiental.
2. Se debe seleccionar materia prima de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar, con buenas características organolépticas, con la finalidad de que aporte significativamente contenido rico en nutrientes, en las etapas de pre tratamiento y fermentación.
3. Se debe estudiar diferentes métodos de pre tratamientos de la materia lignocelulósica, que permitan la deslignificación de los azúcares en una cantidad mayor al 50%, pero sin la generación de más compuestos tóxicos que puedan afectar las etapas de los procesos para la obtención de bioetanol.
4. Se debe diseñar una prueba estadística en la que se estime la concentración de los inhibidores tóxicos y determinar las concentración a la cual la actividad enzimática es afectada por el inhibidor en condiciones de temperatura, pH, °Brix, concentración de inóculo, usando un biorreactor en el que se pueda realizar un proceso continuo o discontinuo y en el que se pueda garantizar el control del aporte de aire en el sistema.
5. Se debe trabajar con mayores cargas de sustratos tipo hojas y tallos, de manera que haya una elevada concentración de azúcares para una mayor productividad volumétrica durante los procesos de producción de bioetanol, ya que el tiempo necesario para alcanzar altos rendimientos en etanol puede variar según los procesos. Será más rentable económicamente aquel proceso en el que se alcancen mayores concentraciones de etanol en el menor tiempo, es decir, aquel proceso que muestre productividades volumétricas más altas.

BIBLIOGRAFÍA

- **Alfani, A., Gallifuoco F., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M. (2000).** Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Magazine Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1 (25), 184-192.
- **Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert. T. I., y Dale, B. E., (2005).** Pretreatment of switch grass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 121-124, 1133-41.
- **Almeida, J. R. M, Gorwa-Grauslund, M. F, H"ahn-H"agerdal, B., Lid'en G., Modig T., Petersson A. (2007).** Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Techno Biotechnology*, pp.340–349.
- **American National Standard Institute (ASTM). (1974).** Standard Method of Test for Lignin in Wood. Designation D 1103-60. American National Standard 013(5), 342-343.
- **American National Standard Institute (ASTM). (1974).** Standard Method of Test for Lignin in Wood. Designation D 1106-56. American National Standard 013(5), 342-343.
- **AOAC. 920.151 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.), Washington, DC.
- **AOAC. 940.26. (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 947.05. (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 960.39. (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 965.17 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 973.41 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 981.10 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.

- **AOAC. 981.12 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **AOAC. 985.29 (2005).** Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed), Washington, DC.
- **Badger, W. y J. Banchemo. (1964).** Introducción a la Ingeniería Química. Editorial Mc Graw – Hill. pp.83, 84.
- **Balat, H. (2009).** Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*. 86, 2273-2282.
- **Ballesteros, M. (2006).** Carburantes sin petróleo: Bioetanol. *Investigación y Ciencia* pp. 78-85.
- **Berlin, A., Gilkes, N., Kilburnn, D., Bura, R., Markov, A., Okunev, O., Gusarov, A., Maximenko, V., Gregg, D., Saddler, J. (2005).** Evaluation of novel fungal cellulose preparation for ability to hydrolyze soft wood substrate-evidence of the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 175-184.
- **Bidlack, J. Malonge. (1992).** “Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants”. *Academy of Science* 72, 51 – 56. Oklahoma.
- **Brook, T. (1993).** Microbiología. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A., pp. 46. México.
- **Carroll, A. y Somerville, C. (2009).** Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 165-182.
- **Chang, V. S., y Holtzapple, M. T. (2000).** Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 84 – 86, 5–37.
- **Chokey, N. (1986).** Cálculos Matemático para Ingeniería Química. Editorial Mc Graw – Hill. (1), 71-82.
- **Delneri, D., Gardner, D. C. J., Bruschi C. V y Oliver S. G. (1999).** Disruption of seven hypothetical aryl-alcohol deshydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast*, 15, 1681-1689.
- **Díaz, Lucas y Portocarrero, Eduardo. (2002).** Manual de producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, pp. 140. Zamorano, Honduras.
- **Dien, B. S., Cotta. M. A., y Jeffries T. W. (2003).** Bacteria engineered for fuel ethanol: Current status. *Appl. Microbiol y Biotechnol.* 63, 258-266.

- **Di Marco, A. A., Romano A. H. (1985).** D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 49 (1), 151-157.
- **Duff, S. J. B. y Murray W.D. (1996).** Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 55 (1): 1-33.
- **Ekman, R. y Holmbom B. (2000).** The chemistry of wood resin. En: Pitch control, wood resin and destination. ED. E. Back, Allen L. pp. 37-76 Atlanta.
- **Elobeid, A., Hart, C., Tokgoz, S. (2011).** The ethanol outlook for Brazil and the United States and implication for livestock. *International Sugar Journal*, p.174-177.
- **Erzinger, G. S., Vitolo, M. (2006).** *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129(13), 787-794.
- **Fengel, D. y Wegener, G. (1984).** Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin.
- **Galbe, M., y Zacchi, G. (2002).** A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 618- 628.
- **García, O. A. M., Ponce, R. E. (2003).** Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotecnología Aplicada*. 20, 85-94.
- **Geankoplis y Christie, J. (1998).** Procesos De Transporte y Operaciones Unitarias. Compañía Editorial Continental S.A. pp. 493- 482. México.
- **Ghose, T. K., Roychoudhury P. K., y Ghosh, P. (1984).** Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic to ethanol under vacuum cycling and step feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 377-381.
- **Glasser, W.G. y Wright, R. S. (1998).** Steam - assisted biomass fractionation. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy*. 2, 14.
- **Hahn-Hägerdal, B. (1994).** Ethanol fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 58, 195-199.
- **Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., y de Bont, J. A. M. (1994).** Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12, 409-415.
- **Hengstebeck, R. (1964).** Destilación, principios y métodos de diseño. Editorial Limusa Grupo Noriega. (1ª ed.) 15,44-46. México.
- **Holland, Ch. (1992).** Fundamentos de Destilación de Mezclas Multicomponentes. Editorial Limusa Grupo Noriega. (1ª ed.) 20,44-46. México.

- **Hon, D. N. S. y Shiraishi, N. (2001).** Wood and Cellulosic Chemistry, second. Dekker, New York.
- **Horta, L. (2008).** Rutas tecnológicas para la obtención de bioetanol, disponible en: <http://web.ing.puc.cl/~power/mercados/Biocombustibles/pagina2.html>
- **INDECOPI. NTP 211.035.2008.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar metanol y congéneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases.
- **INDECOPI. NTP 210.021.3003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar alcoholes superiores.
- **INDECOPI. NTP 210.022.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para Determinar el contenido de metanol.
- **INDECOPI. NTP 211.003.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinas ésteres totales.
- **INDECOPI. NTP 211.038.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar aldehídos.
- **INDECOPI. NTP 221.040.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar acidez total.
- **Imai, T. y Ohono, T. (1995).** The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3604-3608.
- **Itoh, H., (2003).** Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 103, 273-280.
- **Jones, C. W., Doelle, H. W. (1991).** Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35, 4-9.
- **Jorgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007).** Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1, 119-134.
- **Jönsson, L. J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N. O., y Hahn-Hägerdal, B. (1998).** Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 691-697.
- **Kim, S. H., y Hong, J. (2001).** Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*. 77, 139-144.

- **Kohlmann, K. L., Westgate, P. J., Sarikaya, A. (1995).** Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. American Chemical Society National Meeting, Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates, pp. 237–255.
- **Krestschmar, G. (1961).** Alcoholes y Levaduras. Editorial Continental, pp.58-61. EEUU.
- **Krishna, S. H., T., Reddy, J., y Chowdary, G. V. (2001).** Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 77, 193-196.
- **Kister, H., Locket, M., Fair, J. (1999).** Distillation: Still Towering Over Other Options. Chemical Engineering Progress.
- **Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil P., Laopaiboon, P. (2007).** Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1497-1501.
- **Larsson, S., Quintana, S., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., Jonsson, L. J. (2000).** Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and Ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 84-86, 617-632.
- **Manual de Análisis de Alimentos. (1984).** Tecnología de Alimentos. UNALM. Lima – Perú.
- **McKendry, P. (2002).** Energy production from biomass. Over view of biomass. *Bioresource Technology* (1ª Ed). 83, 37-46.
- **Mielenz, J. R. (2001).** Ethanol Production from Biomass: Technology and Commercialization Status. *Current Opinion in Microbiology*. 4, 324–329
- **Montgomery, D. (2002).** Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Limusa S.A. (2ª ed.). México.
- **Morrison, L. (1990).** Química Orgánica. Editorial Addison – Wesley Iberoamericana. (5ª ed.). Wilmington, USA
- **Öhgren, K., Bengtsson O., Hahn-Hägerdal, B. (2006).** Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated com Stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*. pp. 488-498.
- **Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M. F., Galbe M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G. (2006b).** Simultaneous saccharification and co-

fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn Stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 126, 488-498.

- **Palmqvist, E., Hagerdal, B. (2000).** Fermentation of lignocellulosic hydro lysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74(1): 25-33.
- **Palonen, H. (2004).** Role of lignininth enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Tesis Doctoral, disponible en:
<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>
- **Pampulha, M. E., y Lourero-Dias, M. C. (1989).** Combined effect of acetic acid, pH, and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbioly. Biotechnoly.* 31, 547-550.
- **Patle, S. y Lal, B. (2008).** Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* 32, 596-602.
- **Pereira, Xavier Isidro, Albarracín, Jonathan Diego. (2010).** Evaluación del proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos utilizando metodologías de análisis energético e integración de procesos. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga,
- **Prescott, S., y Gordon, C. (1962).** Microbiología Industrial. Editorial Aguilar. (3ª ed.), pp. 997-102,137-150. Madrid España
- **Quesada, J., Villalon, M., Lopez, H. y Lopez, M. (1996).** Manual de Prácticas de Fermentaciones Industriales. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España.
- **Rankine, B. (1995).** Making Good Wine. Editorial Pan Macmillan. Australia.
- **Reid, M. F., Fewson, C. A. (1994).** Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbioly.* 20, 13-56
- **Reusch, W. H. (1979).** Química Orgánica. Editorial Mc Graw Hill, México.
- **Rhodes, A. (1969).** Principios de Microbiología Industrial. Editorial Acribia Zaragoza. España.
- **Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., Meyer, A.S. (2007).** Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143, 27-40.

- **Saha, B. C. (2003).** Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279-291.
- **Sánchez, O. J. y Cardona, C. A. (2007).** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stock. *Bioresource Technology*. Pág. 155.
- **Sánchez, O. J., y Cardona, C. A. (2005).** Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*. 30 (11): 671-678.
- **Sprenger, G. A. (1996).** Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, (145), 301–307.
- **Swings, J., De Ley, J. (1977).** The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. 41 (1), 1-46.
- **Sun Y. y Cheng, J. Y. (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: are views. *Bioresource Technology*. pp. 1-11.
- **Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., y Lidén, G. (2000b)** Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosc. Bioeng.* 87, 169-174.
- **Villanueva, W. (1997).** Seminario de Procesos Químicos Industriales y su Control de Calidad: Elaboración de Alcohol Etilico. Complejo Agroindustrial Cartavio S.A. planta de alcohol. Trujillo.
- **Villar, J., Cañete, R. y García, A. (1986).** La industria de los derivados de la caña de azúcar. Instituto Cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. Cuba.
- **Ward, O. (1989).** Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. Editorial Acribia S.A. (1ª ed.), pp., 82,134). Zaragoza España.
- **Zacchi, G. (2006b).** Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn Stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 126, 488-498.
- **Zhang, Y-HP., Himel, Me, Mielenz, J. R. (2006).** Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24(5): 452-481.

Referencias web.

- **Boletín Informativo de Dirección General de Competitividad Agraria del Ministerio de Agricultura**, disponible en:
http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomia_canaazucar.pdf
- **Composición química de la hoja de caña de azúcar (1995)**, Glosario de Conceptos de caña de azúcar, disponible en: www.cenicana.org. (2013, 20 de Octubre).
- **Especificaciones del bioetanol (2013)**, Glosario de Empresa Agroindustrial Caña Brava S.A., disponible en: www.canabrava.com.pe. (2013, 20 de Octubre).
- **(ICUMSA, 2005)**, Calidad de la caña de azúcar, en la página de La Comisión Internacional para los Métodos Uniformes de Análisis de Azúcares disponible en: <http://www.icumsa.org/>. (2014, 04 de Enero).
- **MINAG (2013)**. En el boletín de Biocombustibles y Marco Tributario. Dirección General de Información Agraria, disponible en: www.minag.gob.pe. (2013, 06 de Noviembre).
- **Partes de la hoja de caña de azúcar (1998)**, Glosario de Manual de plantas agrícolas, disponible en: www.tropicos.org. (2014, 04 de Enero).
- **Proyecto etanol (2009)**, Boletín de Ingeniería Civil y medio ambiente, disponible en: <http://www.miliarium.com/bibliografia/Monografias/Biocombustibles/Bioetanol.asp>. (2014, 14 de Marzo).
- **QTEROS**, Boletín de Tecnología microbiológica. (2009). Disponible en: <http://www.qteros.com/technology/qmicrobe/>. (2014, 14 de Marzo).
- **SICA**. El azúcar en la comunidad andina. Del Proyecto SICA – Banco Mundial – Ecuador (2006), disponible en: <http://www.sica.ec/cadenas/azucar/docs/>. (2014, 14 de Marzo).

ANEXOS

ANEXO I. Análisis de biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

ANEXO 1.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

Análisis	TALLO (%)					HOJA (%)				
	M1	M2	M3	M4	Promedio	M1	M2	M3	M4	Promedio
Humedad	73.53	74.05	72.62	73.94	73.54	73.06	73.2	72.09	71.23	72.38
Grasa total	0.63	0.66	0.65	0.67	0.65	0.93	1.0	0.92	0.94	0.94
Cenizas	3.19	3.15	3.17	3.18	3.17	1.95	2.0	2.05	1.98	2.00
Fibra	22.53	21.97	22.95	22.71	22.54	18.05	18.0	19.05	17.19	18.07
Fosforo	0.11	0.12	0.13	0.11	0.12	0.23	0.21	0.22	0.18	0.21
Nitrógeno total	0.47	0.43	0.45	0.44	0.45	0.19	0.15	0.17	0.17	0.17
Celulosa	41.1	41.07	42.0	41.03	41.30	36.72	37.0	36.15	37.29	36.80
Hemicelulosa	25.95	26.72	25.45	23.86	25.50	21.00	19.50	22.87	20.64	21.00
Lignina	29.1	29.44	30.15	30.12	29.70	29.00	28.00	27.00	28.00	28.00
PH	5.69	5.39	5.81	5.77	5.67	5.05	4.73	4.86	4.39	4.76

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO II. Análisis de fermentación de biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

ANEXO 2.1. Datos de variación de sólidos solubles (°Brix) en la etapa de fermentación.

Día	Hojas x 210°C x 5 min					Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	4.90	4.70	5.00	4.80	4.85	5.00	4.70	4.90	4.60	4.80	4.90	4.70	5.00	5.00	4.90	4.90	5.00	4.60	4.70	4.80
1	4.80	4.60	4.70	4.80	4.73	4.70	4.50	4.80	4.60	4.65	4.90	4.60	4.90	4.70	4.78	4.80	5.00	4.40	4.50	4.68
2	4.20	4.10	4.20	4.00	4.13	4.20	4.00	4.30	4.40	4.23	4.30	4.20	4.00	3.90	4.10	4.10	4.50	3.90	4.00	4.13
3	3.60	3.50	3.70	3.40	3.55	3.50	3.40	3.70	3.60	3.55	3.40	3.60	3.50	3.00	3.38	3.70	3.80	3.50	3.20	3.55
4	3.10	2.80	3.40	3.10	3.10	3.10	2.60	3.00	3.20	2.98	2.80	3.00	2.70	2.40	2.73	3.00	2.90	3.10	2.50	2.88
5	2.50	2.30	2.80	2.40	2.50	2.40	2.00	2.50	2.60	2.38	2.20	2.50	2.00	1.80	2.13	2.30	2.20	2.50	2.00	2.25
6	1.90	1.60	1.50	1.20	1.55	1.00	1.40	1.50	1.80	1.43	1.50	0.90	0.50	0.50	0.85	1.00	1.20	1.60	0.70	1.13
7	0.30	0.40	0.00	0.00	0.18	0.20	0.50	0.00	0.40	0.28	0.40	0.30	0.10	0.20	0.25	0.15	0.25	0.40	0.34	0.29

Día	Tallo x 210°C x 5 min					Tallo x 210°C x 10 min					Tallo x 220°C x 5 min					Tallo x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	5.20	4.90	5.10	5.00	5.05	5.50	5.00	5.20	5.40	5.28	5.00	5.30	4.90	5.00	5.05	5.60	5.20	4.90	5.50	5.30
1	5.10	4.70	4.80	4.90	4.88	5.30	5.00	5.00	5.10	5.10	4.80	4.90	4.60	4.80	4.78	5.40	5.00	4.70	5.30	5.10
2	4.70	4.20	4.20	4.10	4.30	4.60	4.20	4.40	4.50	4.43	4.00	4.10	4.00	4.10	4.05	4.50	4.30	4.20	4.60	4.40
3	4.00	3.60	4.00	3.60	3.80	4.00	3.60	3.90	4.10	3.90	3.50	3.70	3.40	3.30	3.48	3.00	3.50	3.70	4.00	3.55
4	3.20	3.00	3.50	3.10	3.20	3.40	3.10	3.20	3.30	3.25	3.00	3.10	2.80	2.70	2.90	2.40	2.90	3.00	3.50	2.95
5	2.50	2.30	2.80	2.40	2.50	2.50	2.50	2.60	2.50	2.53	2.40	2.70	2.00	1.00	2.03	1.60	2.10	2.40	2.60	2.18
6	1.80	1.50	1.40	1.20	1.48	1.30	1.00	1.60	1.00	1.23	0.80	1.70	0.50	0.50	0.88	0.40	1.10	1.00	1.60	1.03
7	0.30	0.40	0.60	0.20	0.38	0.45	0.40	0.20	0.00	0.26	0.40	0.60	0.20	0.20	0.35	0.20	0.40	0.60	0.30	0.38

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2.2. Datos de variación de pH en la etapa de fermentación.

Día	Hojas x 210°C x 5 min					Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	4.84	4.88	5.13	4.87	4.93	4.51	4.66	4.73	4.84	4.69	4.91	4.94	4.94	5.11	4.98	4.97	4.92	5.00	5.02	4.98
1	4.66	4.77	4.88	4.76	4.77	4.42	4.39	4.65	4.80	4.57	4.78	4.73	4.67	4.63	4.70	4.90	4.91	4.98	4.96	4.94
2	4.43	4.34	4.46	4.44	4.42	4.27	4.18	4.32	4.42	4.05	4.36	4.41	4.32	4.28	4.34	4.85	4.88	4.95	4.90	4.90
3	4.21	4.20	4.20	4.27	4.22	3.80	3.99	4.19	4.17	4.04	4.03	4.02	4.10	4.06	4.05	4.71	4.81	4.87	4.84	4.81
4	3.85	3.82	3.69	4.77	4.03	3.73	3.87	3.91	3.96	3.87	3.92	3.89	3.96	3.94	3.93	4.62	4.62	4.59	4.62	4.61
5	3.82	3.70	3.73	3.87	3.73	3.65	3.73	3.81	3.83	3.76	3.81	3.86	3.86	3.86	3.85	4.33	4.22	4.19	4.22	4.24
6	3.65	3.63	3.65	3.64	3.64	3.56	3.65	3.76	3.72	3.67	3.75	3.86	3.75	3.82	3.80	3.87	3.88	3.80	3.89	3.86
7	3.58	3.53	3.54	3.52	3.54	3.56	3.62	3.58	3.62	3.60	3.71	3.84	3.74	3.80	3.77	3.85	3.87	3.80	3.87	3.85

Día	Tallo x 210°C x 5 min					Tallo x 210°C x 10 min					Tallo x 220°C x 5 min					Tallo x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	5.14	5.22	5.29	5.33	5.25	5.33	5.21	5.32	5.41	5.32	5.33	5.24	5.33	5.41	5.33	5.41	5.44	5.44	5.51	5.45
1	5.21	5.24	5.22	5.29	5.24	5.31	5.21	5.32	5.41	5.31	5.33	5.02	5.29	5.26	5.23	5.37	5.15	5.22	5.37	5.28
2	4.81	4.85	4.81	5.15	4.91	5.13	5.31	5.24	5.37	5.26	5.12	4.82	5.23	5.11	5.07	4.79	4.61	5.16	4.76	4.83
3	4.67	4.81	4.80	5.18	4.87	5.21	5.26	5.21	5.19	5.22	4.76	4.37	4.80	4.56	4.62	4.25	4.86	4.73	4.46	4.58
4	4.85	4.77	4.76	3.83	4.55	5.15	5.22	5.29	5.17	5.21	4.31	4.05	4.73	4.17	4.32	4.14	4.25	4.28	4.23	4.23
5	3.55	3.70	3.82	3.69	3.69	4.72	4.83	4.78	5.19	4.88	3.82	3.95	4.11	4.00	3.97	4.13	4.09	4.13	4.12	4.12
6	3.52	3.64	3.60	3.60	3.59	4.84	4.77	4.74	3.68	4.51	3.80	3.94	4.09	3.98	3.95	4.10	4.00	4.04	4.00	4.04
7	3.52	3.64	3.59	3.58	3.58	3.81	3.61	3.72	3.64	3.70	3.79	3.90	3.99	3.97	3.91	4.09	3.99	4.01	2.97	4.02

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2.3. Datos de variación de acidez (% ác. sulfúrico) en la etapa de fermentación.

Día	Hojas x 210°C x 5 min						Hojas x 210°C x 10 min					
	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	0.963	0.993	0.991	1.094	1.010	0.990	1.212	1.374	1.272	1.095	1.238	1.213
1	1.013	0.964	1.297	1.369	1.161	1.137	1.737	1.310	1.272	1.589	1.477	1.448
2	1.883	1.915	1.959	1.894	1.913	1.875	2.039	1.845	1.814	1.916	1.904	1.865
3	1.907	1.982	1.823	1.777	1.872	1.835	1.768	2.024	1.985	1.883	1.915	1.877
4	1.917	1.950	1.879	1.800	1.887	1.849	2.542	2.432	2.667	2.357	2.499	2.449
5	1.682	1.710	1.618	1.619	1.657	1.624	1.936	2.195	2.212	1.989	2.083	2.041
6	1.640	1.781	1.545	1.747	1.678	1.645	2.628	2.572	2.717	2.648	2.641	2.588
7	1.606	1.773	1.601	1.661	1.660	1.627	2.112	2.339	2.501	1.967	2.230	2.185
Día	Hojas x 220°C x 5 min						Hojas x 220°C x 10 min					
	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.268	1.306	1.216	1.271	1.265	1.240	1.069	1.087	1.257	1.201	1.154	1.131
1	1.374	1.955	1.382	1.283	1.499	1.469	1.386	1.572	1.262	1.237	1.364	1.337
2	2.028	2.003	2.082	2.181	2.074	2.032	1.977	1.935	2.120	1.991	2.006	1.966
3	2.158	1.902	1.959	2.222	2.060	2.019	1.731	1.850	2.180	2.065	1.957	1.918
4	2.375	2.151	2.255	2.266	2.262	2.217	1.814	2.398	2.417	1.969	2.150	2.107
5	2.602	2.316	2.688	2.715	2.580	2.529	1.603	1.928	2.709	2.116	2.089	2.047
6	2.036	2.164	2.153	2.090	2.111	2.068	1.770	2.645	2.086	2.278	2.195	2.151
7	2.050	2.021	2.028	2.086	2.046	2.005	1.819	2.011	2.129	1.975	1.984	1.944
Día	Tallo x 210°C x 5 min						Tallo x 210°C x 10 min					
	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.277	1.191	1.165	1.139	1.193	1.169	1.171	1.366	1.341	1.071	1.237	1.212
1	1.669	1.557	1.528	1.164	1.479	1.450	1.368	1.609	1.646	1.240	1.466	1.437
2	2.120	1.950	1.975	1.925	1.992	1.953	2.031	1.789	1.816	1.948	1.896	1.858
3	2.164	2.065	2.100	1.982	2.078	2.036	1.993	1.816	1.913	2.015	1.934	1.896
4	2.045	1.843	1.940	2.046	1.969	1.929	2.532	2.401	2.319	2.359	2.403	2.355
5	2.804	2.084	2.175	2.173	2.309	2.263	2.100	2.002	2.211	2.177	2.123	2.080
6	2.030	2.309	2.162	2.194	2.174	2.130	2.652	2.497	2.657	2.742	2.637	2.584
7	2.075	1.935	1.935	1.929	1.968	1.929	2.223	2.367	2.565	2.046	2.300	2.254
Día	Tallo x 220°C x 5 min						Tallo x 220°C x 10 min					
	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.279	1.265	1.230	1.241	1.254	1.229	1.009	1.106	1.284	1.189	1.147	1.124
1	1.774	1.897	1.329	1.551	1.638	1.605	1.380	1.589	1.637	1.266	1.468	1.438
2	2.075	2.043	2.076	2.166	2.090	2.048	1.923	1.906	2.131	2.015	1.994	1.954
3	2.015	1.931	2.052	2.065	2.016	1.975	1.782	1.864	2.017	1.978	1.910	1.872
4	2.210	2.260	2.278	2.286	2.258	2.213	1.830	2.347	2.299	2.038	2.128	2.086
5	2.704	2.513	2.540	2.660	2.604	2.552	1.714	1.968	2.384	2.000	2.017	1.976
6	2.054	2.080	2.120	2.055	2.077	2.036	1.768	2.629	2.041	2.316	2.188	2.145
7	2.094	2.034	2.075	2.061	2.066	2.025	1.788	1.960	2.065	2.043	1.964	1.925

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2.4. Rendimiento físico (l.ha⁻¹)

Tratamientos	Sustrato (kg)	Mezcla (sustrato, inóculo y agua)	Fermentación		Destilación		Rectificación		Deshidratación		Porcentajes (%)		Rendimiento por Hectárea	
			Jugo (l)	sustrato (kg)	Alcohol (l)	Vinaza (l)	Alcohol Rect. (l)	Vinaza (l)	Etanol (l)	Vinaza (l)	Residuos	Etanol	Bagazo (kg)	Etanol (l)
Hojas	1.5	15.00	210 °C											
			14.13	0.87	3.917	10.21	1.96	1.96	1.566	0.39	89.56	10.44	60.00	7.46
			14.08	0.92	3.963	10.12	1.97	1.99	1.578	0.40	89.48	10.52	60.00	7.52
			14.07	0.93	4.214	9.86	2.10	2.11	1.683	0.42	88.78	11.22	60.00	8.01
Tallo	1.5	15.00	14.03	0.97	4.313	9.72	2.15	2.16	1.719	0.43	88.54	11.46	60.00	8.19
			14.15	0.85	3.025	11.13	1.51	1.51	1.223	0.29	91.85	8.15	60.00	5.82
			14.20	0.80	3.092	11.11	1.54	1.55	1.244	0.29	91.71	8.29	60.00	5.92
			14.18	0.82	2.887	11.29	1.44	1.45	1.164	0.27	92.24	7.76	60.00	5.54
Hojas	1.5	15.00	14.07	0.93	2.728	11.34	1.36	1.37	1.100	0.26	92.66	7.34	60.00	5.24
			14.26	0.74	5.660	8.60	2.81	2.85	2.245	0.57	85.04	14.96	70.00	12.47
			14.33	0.67	6.028	8.30	3.00	3.03	2.397	0.60	84.02	15.98	70.00	13.32
			14.40	0.60	5.965	8.44	2.95	3.01	2.357	0.60	84.28	15.72	70.00	13.10
Tallo	1.5	15.00	14.37	0.63	6.093	8.28	3.03	3.06	2.423	0.61	83.84	16.16	70.00	13.46
			14.13	0.87	3.914	10.22	1.94	1.97	1.530	0.41	89.80	10.20	70.00	8.50
			14.09	0.91	3.992	10.10	1.98	2.01	1.561	0.42	89.59	10.41	70.00	8.67
			14.22	0.78	3.827	10.39	1.91	1.92	1.504	0.40	89.97	10.03	70.00	8.36
Hojas	1.5	15.00	14.27	0.73	3.510	10.76	1.75	1.76	1.378	0.37	90.82	9.18	70.00	7.65
			14.02	0.98	4.81	9.21	2.38	2.43	1.022	1.36	93.18	6.82	60.00	4.87
			13.88	1.12	4.34	9.54	2.16	2.19	0.968	1.19	93.55	6.45	60.00	4.61
			13.92	1.08	4.56	9.36	2.26	2.30	0.777	1.48	94.82	5.18	60.00	3.70
Tallo	1.5	15.00	14.10	0.90	4.58	9.52	2.28	2.30	1.062	1.22	92.92	7.08	60.00	5.06
			13.66	1.34	5.60	8.06	2.76	2.84	0.525	2.24	96.50	3.50	60.00	2.50
			13.82	1.18	5.29	8.53	2.64	2.65	0.585	2.05	96.10	3.90	60.00	2.79
			13.80	1.20	5.50	8.30	2.72	2.78	0.532	2.19	96.45	3.55	60.00	2.53
Hojas	1.5	15.00	13.88	1.12	5.68	8.20	2.84	2.84	0.560	2.28	96.27	3.73	60.00	2.67
			13.87	1.13	7.86	6.01	3.90	3.97	1.093	2.80	92.71	7.29	70.00	6.07
			14.04	0.96	7.86	6.18	3.92	3.94	1.207	2.71	91.95	8.05	70.00	6.71
			14.03	0.97	7.86	6.17	3.92	3.94	1.195	2.72	92.03	7.97	70.00	6.64
Tallo	1.5	15.00	14.09	0.91	8.00	6.09	3.98	4.02	1.277	2.70	91.49	8.51	70.00	7.09
			13.80	1.20	8.35	5.45	4.17	4.18	0.735	3.43	95.10	4.90	70.00	4.08
			13.66	1.34	8.34	5.32	4.16	4.18	0.732	3.43	95.12	4.88	70.00	4.07
			13.89	1.11	8.29	5.59	4.11	4.18	0.702	3.41	95.32	4.68	70.00	3.90
Hojas	1.5	15.00	13.82	1.18	8.49	5.33	4.16	4.33	0.729	3.43	95.14	4.86	70.00	4.05

Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 2.5. Datos de producción de etanol (%p.v⁻¹) durante el proceso de fermentación.

Hojas x 210°C x 5 min						Hojas x 210°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.280	0.200	0.170	0.230	0.220	0.100	0.050	0.600	0.140	0.223
2	2.200	2.360	2.090	2.870	2.380	2.740	2.690	3.240	2.060	2.683
3	6.520	6.440	6.410	8.654	7.006	5.620	5.330	6.360	5.180	5.623
4	8.920	9.800	9.050	10.334	9.526	7.300	6.530	7.560	6.380	6.943
5	10.120	11.000	10.250	11.534	10.726	8.020	7.490	8.280	7.100	7.723
6	10.840	11.720	10.970	12.014	11.386	8.452	7.970	8.760	7.580	8.191
7	11.080	11.960	11.210	12.254	11.626	8.644	8.210	8.760	7.820	8.359

Hojas x 220°C x 5 min						Hojas x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.020	0.032	0.012	0.020	0.021	0.050	0.040	0.131	0.140	0.090
2	1.220	1.232	1.692	1.700	1.461	2.210	2.440	2.555	2.060	2.316
3	4.580	3.872	4.572	5.060	4.521	2.930	3.160	3.515	3.020	3.156
4	6.260	5.072	5.772	6.500	5.901	3.410	3.640	3.995	3.500	3.636
5	6.980	5.552	6.492	7.220	6.561	3.602	3.832	4.235	3.740	3.852
6	7.292	5.578	6.660	7.532	6.766	3.842	3.856	4.235	4.004	3.984
7	7.292	5.578	6.972	7.532	6.844	3.842	3.856	4.235	4.033	3.991

Tallo x 210°C x 5 min						Tallo x 210°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.380	0.290	0.170	0.280	0.280	0.270	0.260	0.760	0.510	0.450
2	3.260	3.650	3.530	3.424	3.466	1.950	2.180	2.440	2.430	2.250
3	9.980	10.130	10.490	10.384	10.246	6.990	6.980	7.720	7.230	7.230
4	13.340	13.970	14.330	14.464	14.026	9.390	9.140	10.360	8.934	9.456
5	14.780	15.410	15.770	15.904	15.466	10.110	9.860	10.840	9.654	10.116
6	15.500	16.130	16.490	16.624	16.186	10.590	10.340	11.080	9.654	10.416
7	15.740	16.370	16.730	16.864	16.426	10.830	10.580	11.080	9.654	10.536

Tallo x 220°C x 5 min						Tallo x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.130	0.570	0.200	0.420	0.330	0.046	0.016	0.080	0.140	0.071
2	1.810	2.010	1.880	2.100	1.950	2.926	2.656	1.760	2.060	2.351
3	5.890	6.090	5.480	5.940	5.850	3.886	3.616	4.160	4.460	4.031
4	7.090	7.770	7.160	7.860	7.470	4.846	4.576	5.120	5.180	4.931
5	7.570	8.490	8.120	8.820	8.250	5.086	4.816	5.360	5.180	5.111
6	7.882	8.516	8.288	9.060	8.437	5.326	5.056	5.360	5.180	5.231
7	7.882	8.516	8.600	9.060	8.515	5.326	5.056	5.360	5.276	5.255

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2.6. Datos de taza de producción de etanol (g h.l⁻¹)

Día	Hojas x 210°C x 5 min					Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0-1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
1a2	0.08	0.09	0.08	0.11	0.09	0.02	0.02	0.02	0.01	0.10	0.03	0.02	0.04	0.03	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.09
2a3	0.18	0.17	0.18	0.24	0.19	0.03	0.03	0.03	0.03	0.12	0.04	0.03	0.02	0.04	0.13	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04
3a4	0.10	0.14	0.11	0.07	0.11	0.02	0.03	0.03	0.02	0.06	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.04	0.02	0.03	0.02
4a5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01
5a6	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.06	0.03	0.04	0.03	0.02	0.03	0.07	0.06	0.05	0.01	0.05	0.04	0.04	0.05	0.01
6a7	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.06	0.01	0.05	0.03	0.02	0.01	0.00	0.04	0.04	0.05	0.02	0.00

Día	Hojas x 210°C x 5 min					Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0-1	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
1a2	0.12	0.14	0.14	0.13	0.13	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.12	0.11	0.07	0.08	0.10
2a3	0.28	0.27	0.29	0.29	0.28	0.21	0.20	0.22	0.20	0.21	0.17	0.17	0.15	0.16	0.16	0.04	0.04	0.10	0.10	0.07
3a4	0.14	0.16	0.16	0.17	0.16	0.10	0.09	0.11	0.07	0.09	0.05	0.07	0.07	0.08	0.07	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04
4a5	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
5a6	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01
6a7	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO III. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

ANEXO 3.1. Determinación de la concentración del etanol (°G.L.) obtenido en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sum.	Prom.
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	99.93	99.87	99.87	99.64	99.20	99.68	99.78	99.22	1594.44	99.65
	99.66	99.73	99.46	99.68	99.46	99.86	99.62	99.78		
Tallo	99.32	99.05	99.16	99.77	99.48	99.49	99.88	99.88	1592.87	99.55
	99.54	99.55	99.14	99.48	99.67	99.82	99.71	99.93		
Sumatoria	398.45	398.20	397.63	398.57	397.81	398.85	398.99	398.81	3187.31	99.60
Promedio	99.61	99.55	99.41	99.64	99.45	99.71	99.75	99.70		
Temperaturas de extracción por vapor	210 °C =		1592.85		220 °C =		1594.46			
			99.55				99.65			
Periodos tiempo de extracción por vapor	5.0 min =		1593.31		10.0 min =		1594.00			
			99.58				99.63			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.2. Determinación de la densidad (g.cm⁻³) del etanol obtenido en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C									
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sum.				Sum.	Promedio
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	0.834	0.846	0.842	0.838	0.837	0.848	0.837	0.848	13.53	0.85
	0.844	0.863	0.845	0.852	0.844	0.852	0.844	0.852		
Tallo	0.834	0.840	0.847	0.844	0.848	0.872	0.846	0.851	13.56	0.85
	0.844	0.845	0.852	0.843	0.839	0.854	0.849	0.855		
Sumatoria	3.36	3.39	3.39	3.38	3.37	3.43	3.38	3.41	27.09	0.85
Promedio	0.84	0.85	0.85	0.84	0.84	0.86	0.84	0.85		
Temperaturas de extracción por vapor	210 °C =		13.51		220 °C =		13.58			
			0.84				0.85			
Periodos tiempo de extracción por vapor	5.0 min =		13.54		10.0 min =		13.55			
			0.85				0.85			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.3. Determinación del pH para el etanol obtenido en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sum.	Prom.
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	7.75	7.58	7.55	8.05	8.02	7.68	7.78	8.22	125.47	7.84
	7.71	7.89	7.63	7.97	7.86	8.13	7.62	8.03		
Tallo	8.00	7.98	7.76	7.77	7.68	8.09	7.88	8.00	126.00	7.88
	8.04	7.95	7.64	7.88	7.67	7.82	7.91	7.93		
Sumatoria	31.50	31.40	30.58	31.67	31.23	31.72	31.19	32.18	251.47	7.86
Promedio	7.88	7.85	7.65	7.92	7.81	7.93	7.80	8.05		
Temperaturas de extracción por vapor		210 °C =		125.15	220 °C =		126.32			
				7.82			7.89			
Periodos tiempo de extracción por vapor		5.0 min =		125.85	10.0 min =		125.62			
				7.87			7.85			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.4. Determinación de alcoholes superiores (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sum.	Prom.
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	196.70	169.04	167.94	264.17	301.91	210.43	303.72	232.48	3643.74	227.73
	209.87	177.16	166.55	231.67	286.93	183.21	352.90	189.07		
Tallo	213.28	199.95	219.94	199.49	227.17	213.30	230.82	203.93	3381.80	211.36
	208.28	183.59	201.54	223.35	218.08	205.32	233.56	200.21		
Sumatoria	828.12	729.75	755.96	918.67	1034.09	812.26	1120.99	825.69	7025.54	219.55
Promedio	207.03	182.44	188.99	229.67	258.52	203.07	280.25	206.42		
Temperaturas de extracción por vapor			210 °C = 3232.50		220 °C = 3793.04					
			202.03		237.06					
Periodos tiempo de extracción por vapor			5.0 min = 3404.22		10.0 min = 3621.32					
			212.76		226.33					

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.5. Determinación de aldehídos (ppm Furfural) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sumatoria	Promedio
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	5.37	5.98	5.97	5.93	5.24	6.02	6.79	6.03	94.41	5.90
	5.34	5.96	5.77	5.92	5.29	6.01	6.76	6.06		
Tallo	5.15	5.67	5.66	6.01	6.81	5.90	6.78	6.81	97.91	6.12
	5.22	5.82	5.81	5.95	6.81	5.93	6.77	6.82		
Sumatoria	21.08	23.43	23.21	23.80	24.15	23.84	27.10	25.72	192.33	6.01
Promedio	5.27	5.86	5.80	5.95	6.04	5.96	6.77	6.43		
Temperatura s de extracción por vapor	210°C = 91.52				220 °C = 100.81					
Periodos tiempo de extracción por vapor	5.0 min = 92.51				10.0 min = 99.82					
	5.78				6.24					

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.6. Datos del Gasto de hidróxido de sodio (mL) en soluciones alcohólicas obtenidas como producto.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor							
	210 °C				220 °C			
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor			
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min	
Hojas	0.73	0.46	0.70	0.84	0.80	0.86	0.91	0.95
	0.64	0.68	0.85	0.80	0.82	0.85	0.97	0.88
Tallo	0.83	0.62	0.74	0.76	0.82	0.87	0.98	0.99
	0.62	0.70	0.63	0.72	0.81	0.85	1.02	0.96

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.7. Datos de la Acidez Total (mg Ácido Acético /L Alcohol Anhidro) del etanol obtenido como producto.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sum.	Prom.
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	43.831	27.636	42.055	50.462	48.387	51.766	54.720	57.448	767.11	47.94
	38.772	40.910	50.975	48.154	49.467	51.192	58.422	52.916		
Tallo	50.383	37.557	44.776	45.705	49.457	52.588	58.871	59.471	779.04	48.69
	37.372	42.190	38.128	43.426	48.761	51.332	61.378	57.640		
Sumatoria	170.36	148.29	175.93	187.75	196.07	206.88	233.39	227.48	1546.15	48.32
Promedio	42.59	37.07	43.98	46.94	49.02	51.72	58.35	56.87		
Temperaturas de extracción por vapor			210 °C = 682.33 42.65		220 °C = 863.82 53.99					
Periodos tiempo de extracción por vapor			5.0 min = 721.60 45.10		10.0 min = 824.55 51.53					

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.8. Determinación de esteres (ppm Acetato de etilo) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sum.	Prom.
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	250.66	271.76	271.54	268.18	296.98	270.04	304.22	291.79	4463.00	278.94
	256.66	270.78	262.70	267.85	267.28	306.72	301.76	304.07		
Tallo	239.93	246.36	240.61	256.27	298.00	283.67	320.87	308.60	4403.84	275.24
	242.76	242.57	247.74	263.67	300.80	281.89	321.89	308.22		
Sumatoria	990.02	1031.46	1022.60	1055.97	1163.06	1142.32	1248.74	1212.68	8866.85	277.09
Promedio	247.50	257.87	255.65	263.99	290.76	285.58	312.19	303.17		
Temperaturas de extracción por vapor		210 °C =		4100.04	220 °C =		4766.80			
				256.25			297.93			
Periodos tiempo de extracción por vapor		5.0 min =		4326.86	10.0 min =		4539.99			
				270.43			283.75			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3.9. Determinación de Metanol (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sumatori a	Promedio
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	27.58	27.57	29.06	34.49	34.86	32.30	37.46	35.51	515.76	32.24
	27.70	27.57	28.57	32.55	34.46	31.65	37.94	36.48		
Tallo	137.20	167.41	241.65	135.79	256.68	316.08	328.26	285.16	4285.75	267.86
	176.62	284.63	358.56	85.80	349.14	371.95	306.83	483.97		
Sumatoria	369.11	507.18	657.85	288.64	675.14	751.98	710.50	841.12	4801.51	150.05
Promedio	92.28	126.79	164.46	72.16	168.78	188.00	177.62	210.28		
Temperatura s de extracción por vapor	210 °C = 1822.77				220 °C = 2978.74					
Periodos tiempo de extracción por vapor	5.0 min = 2303.41				10.0 min = 2498.10					
	143.96				156.13					

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO IV. Fotos de los diferentes procedimientos para la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.

ANEXO 4.1. Procedimiento de los análisis de calidad de la biomasa lignocelulósica.



Secado de las muestras

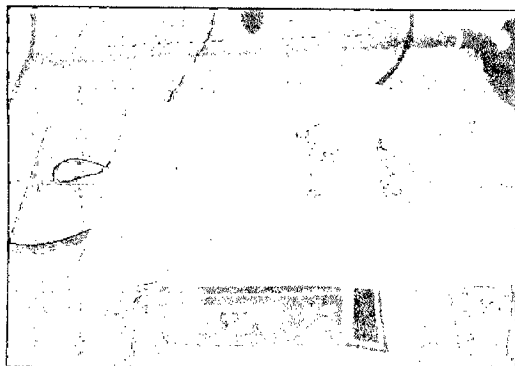


Muestras en el laboratorio

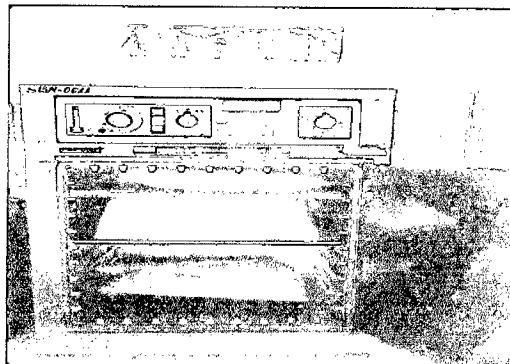
Fuente: Elaboración propia

ANEXO 4.2. Fotos de los análisis físico – químico de la materia prima.

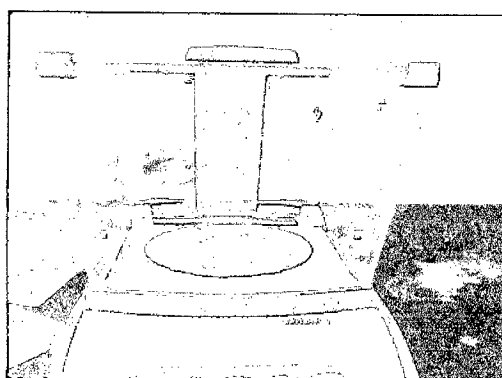
En este anexo se muestra fotos de los diferentes análisis físico – químico descritos en el apartado 2.4.3.



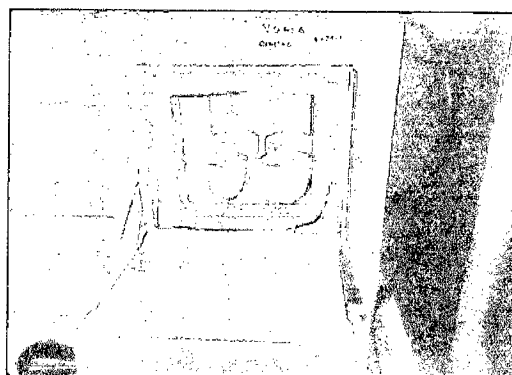
Pesado de una muestra para el análisis de humedad.



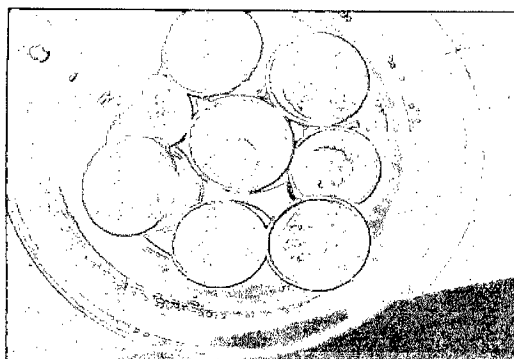
Secado de las muestras en la estufa a 65°C por 48 horas.



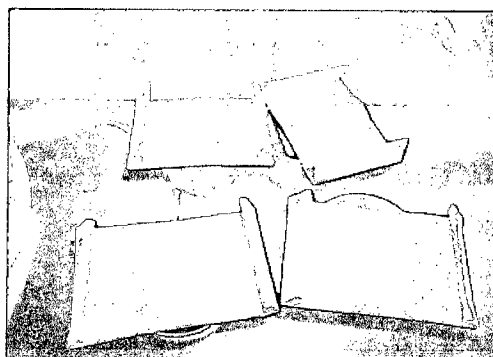
Pesado de una muestra para los análisis de celulosa, hemicelulosa.



Secado de las muestras en la mufla a 550°C por 24 horas para la determinación de cenizas.



Muestras de cenizas



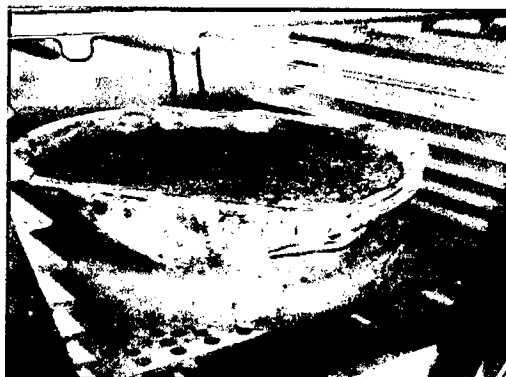
Muestras en cartuchos para la determinación de grasa

Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 4.3. Fotos del pre tratamiento de la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.



Preparación de las muestras (adición de agua)



Muestra en la estufa para la deslignificación.



Muestra pre tratada a $210^{\circ}\text{C} \times 5\text{min}$.



Vertiendo la muestra pre tratada para enfriar.

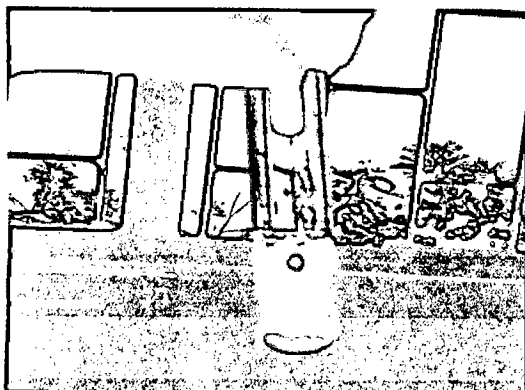


Enfriamiento de la muestra a 30°C .

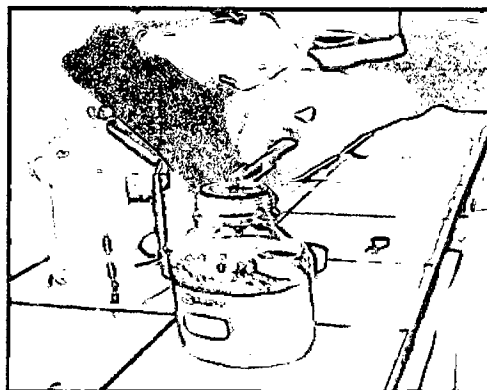
Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 4.4. Fotos del proceso de fermentación de la biomasa lignocelulósica.

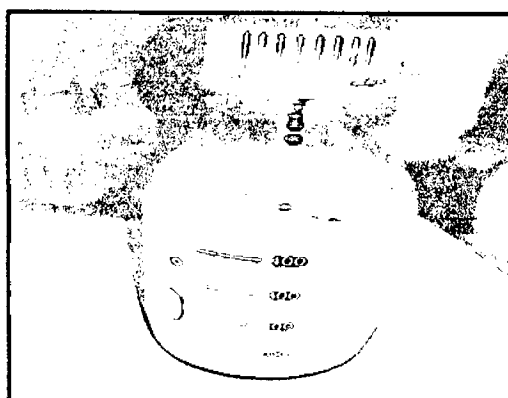
Anexo 4.4.1. Fotos de la preparación del inóculo de la bacteria *zymomonas mobilis*.



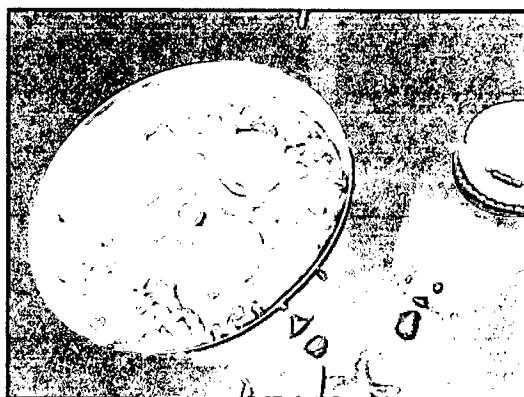
Cepa de Bacteria *zymomonas mobilis*.



Adición de la bacteria al jugo de caña de azúcar.



Inóculo de *Z. mobilis*.



Multiplicación de microorganismos de *Z. mobilis* (inóculo listo para usar).

Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 4.4.2. Fotos de la etapa del proceso de fermentación de la biomasa lignocelulósica.



Instalación de los tanques de fermentación.



Adición de la muestra a los tanques de fermentación.

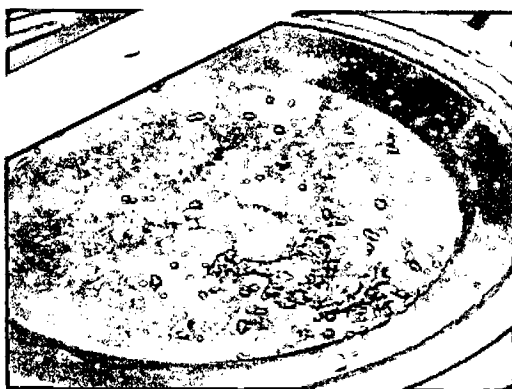


Imagen del mosto en la etapa inicial de fermentación.

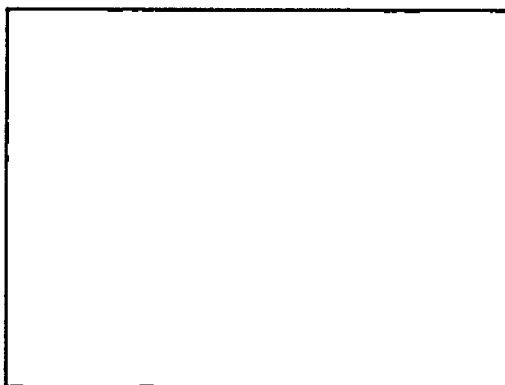
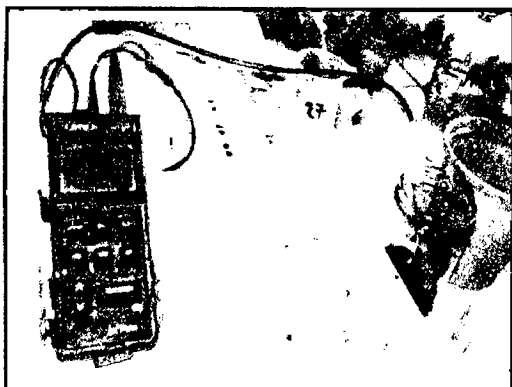


Imagen del mosto en la etapa final de fermentación.



Medición del pH.



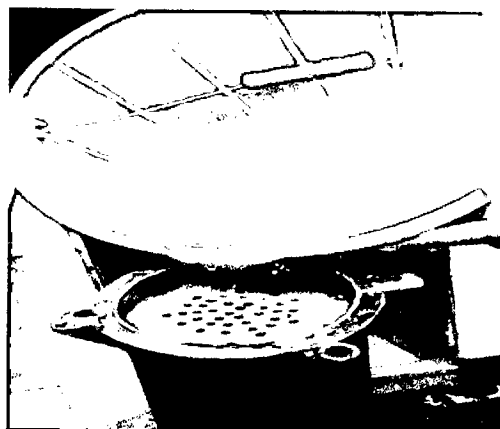
Medición de los grados °Brix.

Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 4.5. Fotos del proceso de destilación para la obtención de bioetanol.



Prensando y filtrado del jugo fermentado.



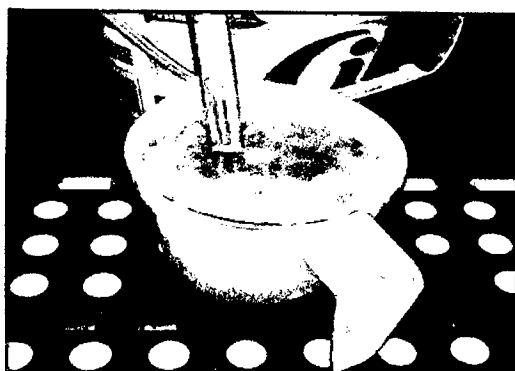
Vertiendo el jugo filtrado a la columna de destilación.



Destilación simple.



Controlando la temperatura de destilación.

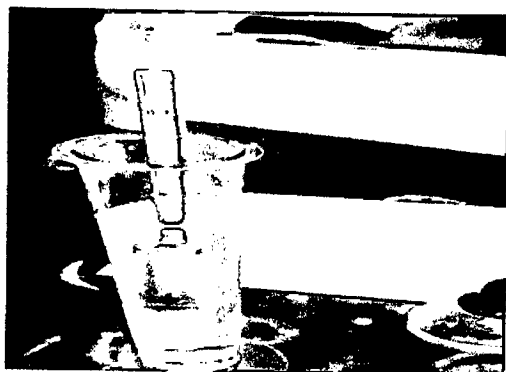


Destilación del bioetanol.

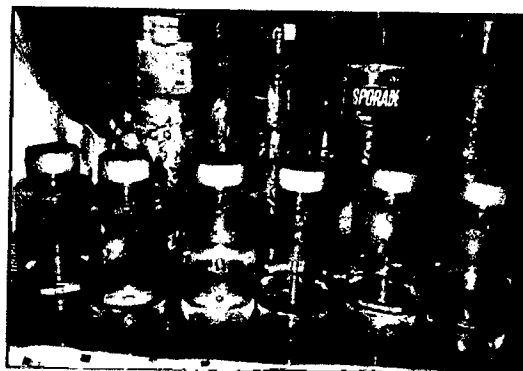


Obtención de la vinaza.

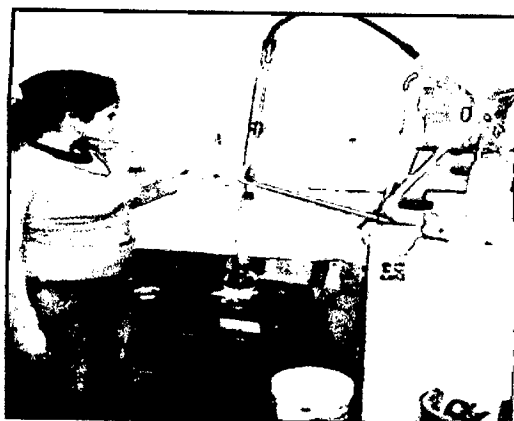
Fuente: Elaboración Propia.



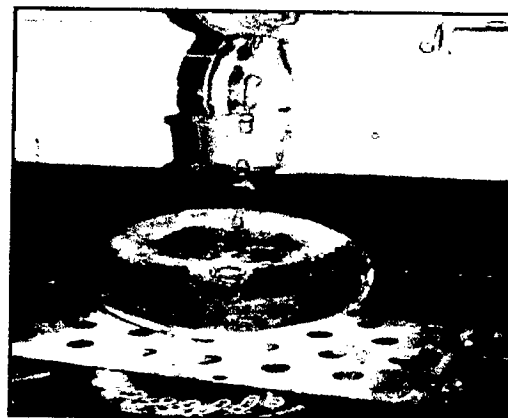
Lectura directa del grado
alcohólico en °G.L.



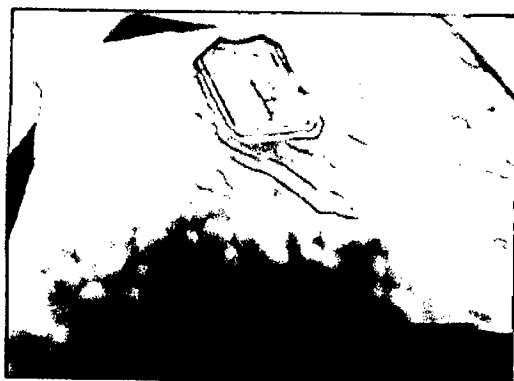
Muestras obtenidas de
bioetanol.



Destilación fraccionada.



Calentamiento de la muestra
de destilación fraccionada.



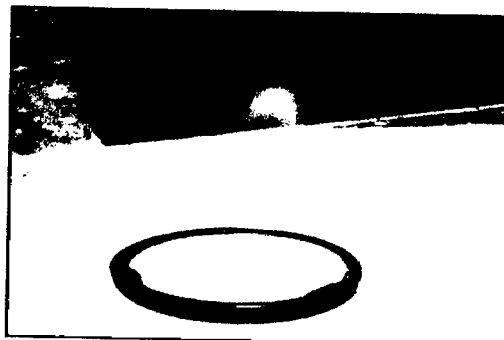
Zeolitas para el alcohol
deshidratado.



Deshidratado del bioetanol.



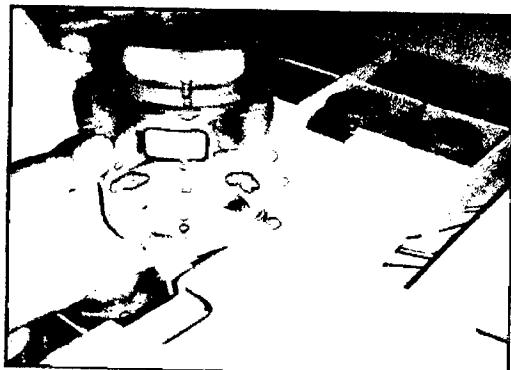
Obtención de bioetanol como producto.



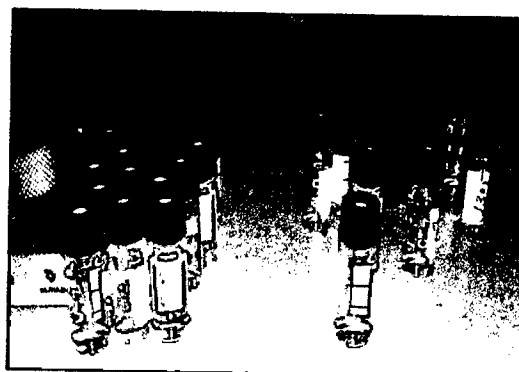
Prueba de obtención de bioetanol.

Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO 4.6. Fotos del análisis del bioetanol obtenido como producto.



Presentación de muestras de bioetanol.



Soluciones patrón y muestras a analizar en el cromatógrafo de gases.



Análisis de las muestras en el cromatógrafo de gases.



Lectura digital del grado alcohólico y densidad del bioetanol.

Fuente: Elaboración Propia.